

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Ramaprasad BANERJEE

1^{re} THÈSE. — ACTION DE L'URÉE ET DU CHLORHYDRATE DE
GUANIDINE SUR LES PROPRIÉTÉS OXYDORÉDUCTRICES
DE L'HÉMOGLOBINE ET DE COMPLEXES APPARENTÉS.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

devant la Commission d'examen

MM. WURMSER . *Président*

LEDERER. . . } *Examineurs*

Mlle QUINTIN. . . }

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Ramaprasad BANERJEE

1^{re} THÈSE. — ACTION DE L'URÉE ET DU CHLORHYDRATE DE
GUANIDINE SUR LES PROPRIÉTÉS OXYDORÉDUCTRICES
DE L'HÉMOGLOBINE ET DE COMPLEXES APPARENTÉS.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

devant la Commission d'examen

MM. WURMSER . *Président*

LEDERER. . . } *Examineurs*

Mlle QUINTIN. . . }



FACULTE des SCIENCES de L'UNIVERSITE de PARIS

- PROFESSEURS -

Doyen J. PÈRES

AULIA	Analyse supérieure et Algèbre supér.	NORMANT	Chimie organique (P.C.B.)
CH	Mécanique physique et expérimentale	BENARD	Chimie (P.C.B.)
BROGLIE	Théories physiques	BUVAT	Botanique (E.N.S.)
INANT	Anatomie et Histologie comparée	DUGUE	Statistiques mathématiques
ES	Mécanique des fluides et applications	GELOSO	Chimie (S.P.C.N.)
CURIE	Physique (S.P.C.N.)	SOULAIRAC	Psychophysiologie
RRABÉ	Géologie structurale et Géologie appliquée	ULRICH	Physiologie végétale
OURCART	Géographie phys. et Géologie dynamique	MARECHAL	Optique théorique et appliquée
ANTEFOL	Botanique	KIRRMANN	Théories chimiques
ASSE	Evolution des êtres organisés	CHADEFAUD	Botanique
EVOST	Chimie organique	DESTRIAU	Physique (M.P.C.)
ULIGAND	Application de l'analyse à la Géométrie	Mlle LE BRETON	Physiologie générale
AUDRON	Chimie appliquée	SALEM	Mathématiques générales
ART	Minéralogie	LELONG	Mathématiques générales
SSIER	Zoologie	DEVILLERS	Anatomie et Histologie comparée
NGENOT	Biologie végétale	EHRESMANN	Topologie algébrique
AUGER	Physique quantique et Relativité	FRANCON	Physique (S.P.C.N.)
NNIER	Physiologie des fonctions	GLANGEAUD	Géographie phys. et Géologie dynamique
ETEAU	Paléontologie	GODEMENT	Mathématiques (M.P.C.)
CARD	Physique (E.N.S.)	PISOT	Calcul des probabilités
CARTAN	Mathématiques (E.N.S.)	E. ROCH	Géologie
FFITTE	Chimie générale	SCHATZMANN	Astrophysique
VARD	Mécanique générale	TERMIER	Paléontologie stratigraphique
LOMB	Physique du Globe	ZAMANSKY	Mathématiques générales
COUSIN	Biologie animale (S.P.C.N.)	LENNUIER	Physique (P.C.B.)
RETIEN	Chimie minérale	RIZET	Génétique
DRACH	Zoologie	ROUTHIER	Géologie appliquée
ETLER	Physique	Mme TONNELAT	Théories physiques
RUSSI	Génétique	DIXMIER	Mathématiques (M.P.C.)
RMSEER	Biologie physico-chimique	SOUCHAY	Chimie générale (P.C.B.)
IERE	Géologie (S.P.C.N.)	AIGRAIN	Physique (P.C.B.)
UTHERET	Biologie végétale (P.C.B.)	BRUSSET	Chimie minérale
EAS	Recherches physiques	M. LEVY	Physique théorique
THOMAS	Biologie cellulaire	Mme CHAIX	Chimie biologique
MULF	Optique appliquée	Mme HUREL-PY	Biologie végétale (P.C.B.)
MORAND	Enseignement de Physique	PIAUX	Chimie (P.C.B.)
LEILLET	Physique	BRUN	Mécanique expérimentale des fluides
ETTER	Mécanique expérimentale des fluides	LEDERER	Chimie biologique
ONJON	Astronomie	Mme DUBREIL	Mathématiques
ORTE	Physique générale et Radioactivité	Mme LELONG	Mathématiques (E.N.S.)
ET	Mécanique analyt. et Mécanique céleste	BELLAIR	Géologie (S.P.C.N.)
IT	Biologie maritime	COTTE	Physique (M.P.C.)
ENEY	Météorologie et Dynamique atmosphér.	J.-E. DUBOIS	Chimie (S.P.C.N.)
LLIEN	Embryologie	LAMOTTE	Zoologie (E.N.S.)
HHORN	Biologie végétale (P.C.B.)	LE ROLLAND	Mécanique des fluides
UGNAC	Biologie végétale (P.C.B.)	MICHEL	Chimie (S.P.C.N.)
CAUCHOIS	Chimie physique	OLMER	Énergétique générale
ELLIER	Physique du Globe	ROUAULT	Physique (Enseignement)
ÉRITIER	Génétique	GAUTHIER	Mécanique appliquée
VET	Radioélectricité	BARCHEWITZ	Chimie physique
NCIN	Mécanique des fluides	BROSSEL	Physique atomique
BREIL	Arithmétique et théorie des nombres	BUSER	Biologie animale (P.C.B.)
ELET	Chimie organique	CAMUS	Biologie végétale (P.C.B.)
ENIARD	Géophysique appliquée	CASTAING	Physique générale
PMPETIER	Chimie macromoléculaire	CURIEN	Minéralogie et Cristallographie
ILLIER	Géologie structurale et Géologie appliquée	MOYSE	Physiologie végétale
IG	Pétrographie	NOIROT	Evolution des êtres organiques
ALLAT	Microscopie et Diffraction électronique	PANNETIER	Chimie (P.C.B.)
AMANN	Chimie organique et structurale	POSSOMPES	Biologie animale (P.C.B.)
QUINOT	Spectroscopie et Physique céleste	PULLMANN	Chimie théorique
SSY	Physique de l'atmosphère	TEILLAC	Physique nucléaire et Radioactivité
TOUCHES	Théories physiques	TONNELAT	Biologie physico-chimique
PRUVOST	Géologie	VILLE	Econométrie
HEL	Chimie générale (P.C.B.)	WILLEMART	Chimie (P.C.B.)
CART	Minéralogie	DODE	Chimie
M. MATHIEU	Physique (P.C.B.)	FREYMANN	Physique (S.P.C.N.)
UTEAUX	Biologie animale (P.C.B.)	GUINOCHET	Biologie végétale (ORSAY)
Y	Biologie animale (P.C.B.)	ROLLET	Chimie (P.C.B.)
DOQUET	Calcul différentiel et intégral	Mlle JOSIEN	Chimie (P.C.B.)
DMANN	Biologie (P.C.B.)	CHEVALLEY	Géométrie Algébrique et théorie des groupes
NIER	Physique générale (P.C.B.)		
T	Physiologie comparée		
ETET	Calcul des probabilités		
WARTZ	Méthode mathématique de la physique		
OUARD	Physiologie végétale		
LAVARO	Aviation		
CLOT	Calcul différentiel		

Secrétaire général C. MONIER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547114_0004

ACTION DE L'URÉE ET DU CHLORHYDRATE DE GUANIDINE
SUR LES PROPRIÉTÉS OXYDORÉDUCTRICES DE L'HÉMOGLOBINE
ET DE COMPLEXES APPARENTÉS.

* * *

Le présent travail a été effectué dans le laboratoire de Biologie physicochimique de la Faculté des Sciences de Paris, sous la direction de Monsieur le Professeur René Wurmser. Je lui exprime ma profonde gratitude pour l'accueil bienveillant qu'il m'a réservé, pour l'intérêt constant qu'il a porté à mon travail, comme aussi pour son enseignement.

J'exprime ma vive reconnaissance à Madame Colson-Guastalla, Chef des Travaux, dont les conseils m'ont été précieux.

Les mesures magnétochimiques ont été effectuées au laboratoire de Monsieur le Professeur Amiel, que je remercie bien vivement.

L'accueil amical et chaleureux que m'ont apporté tous mes camarades du laboratoire de Biologie physicochimique me laissera un excellent souvenir.

Il m'est agréable de rappeler enfin que ces études n'ont été rendues possibles que grâce à l'allocation de recherches qui m'a été accordée par le Centre National de la Recherche Scientifique.

* *

*

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
----------------------	---

PREMIERE PARTIE: ACTION DE L'UREE

A. <u>Modification du potentiel d'oxydoréduction du système hémoglobine-méthémoglobine en présence d'urée 4 M.</u>	
1. Introduction à l'étude du système oxydoréducteur hémoglobine-méthémoglobine	3
2. Etudes antérieures de l'effet de l'urée sur le potentiel	6
3. Effet de la température sur la modification du potentiel	7
4. Nature instantanée de l'action de l'urée sur le potentiel d'oxydoréduction	8
B. <u>Recherches en vue de localiser l'action primaire de l'urée</u> ..	10
1. Intérêt de l'étude des complexes hémine-base azotée	11
2. L'hémine: structure, ionisations	12
3. Système oxydoréducteur hémine réduite et oxydée, seules et en présence d'une base complexante	14
4. Etude expérimentale du potentiel d'oxydoréduction des complexes hémine-base azotée, en absence et en présence d'urée 4 M.	
a) Technique	19
b) Matériel	20
c) Résultats des titrages d'oxydoréduction	21
d) Variation de ΔE avec la température	24
e) Remarques sur l'état d'aggrégation	25

5.	Détermination expérimentale des constantes de dissociation des complexes hémine-base azotée en absence et en présence d'urée 4 M.	
a)	Formule stoechiométrique du complexe	30
b)	Détermination des constantes de dissociation	35
6.	Comparaison des résultats relatifs à l'effet de l'urée sur le potentiel du système hémine-pilocarpinate et sur les valeurs des constantes de dissociation	36
7.	Discussion sur le mécanisme d'action de l'urée	42
8.	Schéma des réactions métalloporphyrine-base azotée	51
a)	Ferrihémine-base: effet de compétition de l'ion hydroxyle	51
b)	Ferrohémine-base	55
c)	Constantes d'équilibre	55
d)	Effet de l'urée sur la dissociation des complexes ..	57
e)	Effet d'une variation de la température sur ΔE ($\partial \Delta E / \partial T$): analyse des résultats antérieurs	58
9.	Effet sur ΔE et sur les constantes de dissociation globales d'autres agents susceptibles de modifier la constante diélectrique	61
10.	Discussion d'ensemble des résultats	68
C.	<u>Résumé, première partie</u>	69
	DEUXIEME PARTIE: ACTION DE LA GUANIDINE	73
A.	<u>Effet de la guanidine (0,9 molaire) sur le potentiel d'oxydoréduction du système hémoglobine-méthémoglobine</u>	74
1.	Nature instantanée de l'action de la guanidine	79
2.	Données thermodynamiques relatives à l'action primaire de la guanidine	80

B. <u>Analyse de l'action de la guanidine</u>	83
1. Action de l'ammoniaque et de la guanidine sur le spectre d'absorption de la méthémoglobine basique	84
2. Action de la guanidine sur la susceptibilité magnétique de la méthémoglobine (basique et acide):	
a) Mesure des susceptibilités magnétiques	87
b) Matériel	89
c) Pratique d'une mesure	90
d) Résultats	91
3. Conclusion	95
C. <u>Résumé, deuxième partie</u>	97
CONCLUSIONS	99
BIBLIOGRAPHIE	103

*

*

*

INTRODUCTION

Les hémoprotéines sont des protéines colorées dont les propriétés spectrales dans le visible caractérisent le groupe prosthétique et les liaisons qui l'attachent à la partie globine. Les hémoprotéines ont, en outre, des propriétés oxydoréductrices. Elles doivent aussi ces propriétés au groupe prosthétique; le potentiel d'oxydoréduction des hémoprotéines dépend toutefois non seulement de ce groupe, mais aussi de la partie globine. Des transformations, même petites, de part et d'autre peuvent entraîner une modification du potentiel d'oxydoréduction.

Des études antérieures ont montré que l'urée 4 M apporte une modification du potentiel d'oxydoréduction du système hémoglobine méthémoglobine. Il s'agit d'une action immédiate, antérieure à toute modification profonde des hémoprotéines.

Nous nous sommes d'abord proposé de tenter de localiser cet effet primaire immédiat de l'urée, en analysant le mécanisme de l'action de ce corps (a) sur le groupe prosthétique et (b) sur la liaison hème-globine.

L'action spécifique de l'urée sur le groupe prosthétique est étudiée par spectrophotométrie et magnétochimie; on discute quelle part cette action peut apporter à l'effet global observé sur le potentiel.

L'effet de l'urée sur la liaison hème-globine est abordé en utilisant des "modèles" apparentés: complexes hémine-base azotée, pour lesquels il est possible d'étudier à la fois l'effet de l'urée sur le poten-

tiel d'oxydoréduction et sur les constantes de dissociation hémine-base azotée. On peut ainsi prévoir, par extension, la part que l'action de l'urée sur la liaison hème-globine apporte au potentiel. Cette étude constitue la première partie du présent travail.

D'autre part, il nous a paru intéressant de rechercher si d'autres agents dénaturants apparentés à l'urée manifestaient, comme elle, une action primaire sur l'hémoprotéine. La guanidine provoque, comme l'urée, un abaissement du potentiel antérieurement à toute dénaturation proprement dite. La deuxième partie de notre travail est consacrée à l'analyse de l'action primaire de la guanidine sur l'hémoprotéine et à la comparaison de cette action avec celle de l'urée.

*

*

*

PREMIERE PARTIE

ACTION DE L'UREEA. Modification du potentiel d'oxydoréduction du système
hémoglobine-méthémoglobine en présence d'urée 4 M.1. Introduction à l'étude du système oxydoréducteur hémoglobine-
méthémoglobine.

L'hémoglobine et la méthémoglobine peuvent se transformer réversiblement l'une en l'autre par perte ou gain d'un électron. Un mélange de ces deux corps constitue donc un système oxydoréducteur. Conant et ses collaborateurs [9,10] ont été les premiers à étudier ce système, en travaillant par la méthode des mélanges, et ont donné des valeurs du potentiel de demi-réduction assez proches de celles obtenues plus récemment; des difficultés techniques les ont pourtant empêchés de trouver des données concordantes pour "n", nombre d'électrons en jeu. La difficulté de ces déterminations tient au fait que l'hémoglobine et la méthémoglobine sont toutes deux peu électroactives. Plus tard, l'emploi d'un colorant électroactif, ajouté en faible quantité comme intermédiaire, a permis à Taylor et Hastings [35] d'entreprendre des titrages précis de la méthémoglobine par réduction.

Ces études montrent en premier lieu que le système oxydoréducteur dans ces hémoprotéines est localisé dans le groupe prosthétique métallo-

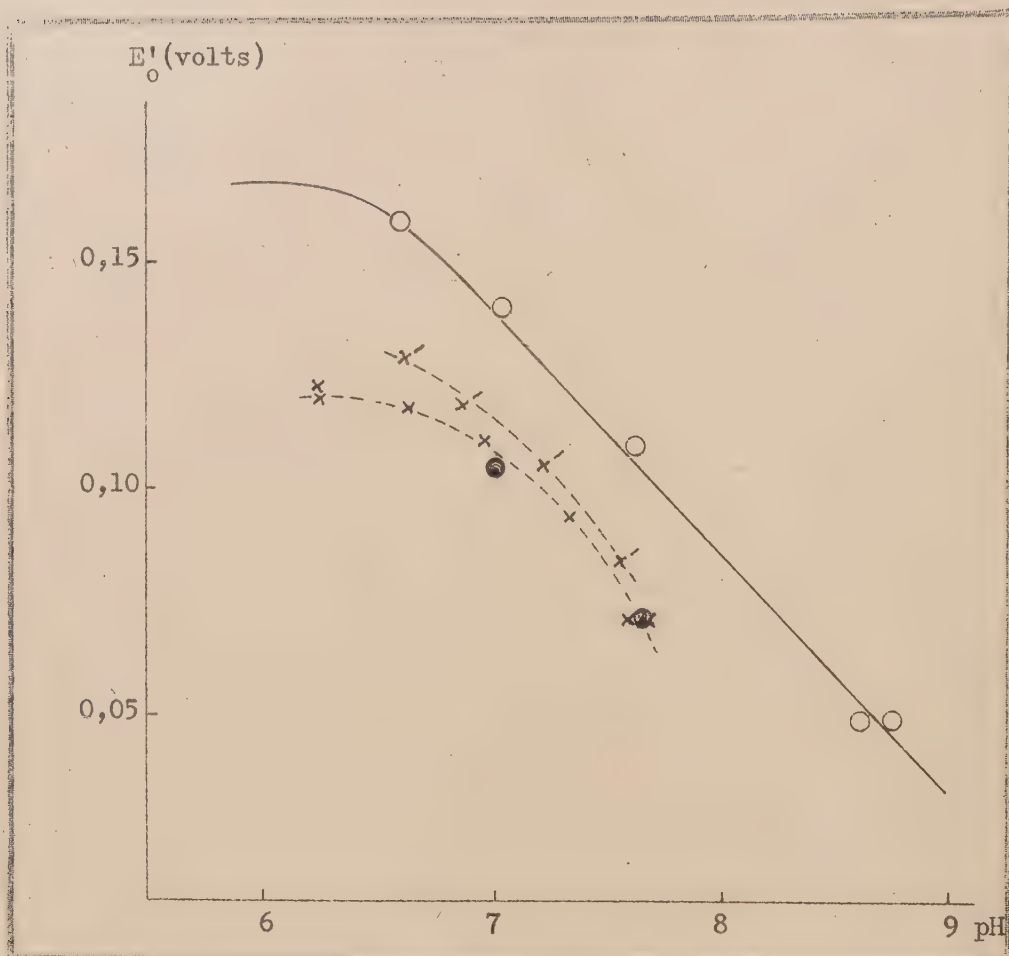


Figure 1. Effet de l'urée (4 M et 2 M) sur le potentiel de demi-réduction de la méthémoglobine de cheval. La courbe en trait plein représente la loi de variation du potentiel de demi-réduction de la méthémoglobine en solution tamponnée, en fonction du pH, d'après les résultats de Taylor et Hastings.

En ordonnées: potentiel en volts.

En abscisses: pH.

- o points correspondant à nos propres résultats en tampon.
- x' points correspondant à nos propres résultats en urée 2 M.
- points correspondant à nos propres résultats en urée 4 M.
- x points correspondant aux résultats de Taylor en urée 4 M.

Température: 30°C.

porphyrique (l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine par le ferri-cyanure se fait "atome de fer à atome de fer"). Conant et ses collaborateurs [8] en travaillant avec le groupe prosthétique isolé (hémine) avaient trouvé la même équivalence stoechiométrique; ils en avaient conclu que le passage de la forme oxydée à la forme réduite se fait par gain d'un électron pour chaque atome de fer situé au centre du groupe prosthétique.

Les travaux des différents auteurs sur le système hémoglobine-méthémoglobine conduisent à l'application de l'équation classique donnant le potentiel (E) en fonction du taux d'oxydation (X), à un pH donné:

$$E = E'_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{X}{1-X}$$

Les valeurs de E'_0 obtenues par Taylor et Hastings [35] à 30°C sont portées dans la figure 1 qui montre les lois de variation du potentiel E'_0 en fonction du pH dans les différentes régions de pH. Ces résultats font croire à l'intervention d'un groupe dont le pK apparent d'ionisation serait proche de 6,5.

Par l'analyse de leurs courbes de titrage, ces auteurs font état d'une dissymétrie dans ces courbes correspondant à une variation progressive de la valeur de "n" au cours du titrage. Pour un taux peu élevé d'oxydation on trouve une pente correspondant à $n = 1$, qui change progressivement au cours de l'oxydation pour atteindre une valeur correspondant à $n = 2$.

On interprète ces valeurs fractionnaires de "n" en admettant l'existence d'une interaction entre les quatre hèmes de la molécule d'hémoglobine; l'oxydation d'une unité faciliterait l'oxydation des autres [29,12]. Pour

la molécule de myoglobine qui ne contient qu'une unité d'hème, on trouve en effet $n = 1$ [36]. On pense que les quatre hèmes dans la molécule d'hémoglobine sont disposés en deux paires, l'interaction entre les hèmes d'une paire serait plus grande que l'interaction entre ceux appartenant à deux paires différentes [40].

2. Etudes antérieures de l'effet de l'urée sur le potentiel.

Taylor a étudié le potentiel d'oxydoréduction du système hémoglobine-méthémoglobine en présence d'urée 4 M. Pour l'hémoglobine de cheval et de chien il a pu opérer par titrage en milieu urée 4 M sans difficulté, car il n'y a pas d'évolution de l'hémoprotéine dans ces conditions. Ses résultats montrent un abaissement du potentiel de demiréduction, de 35 à 40 mV environ dans une zone de pH étendue, la loi de variation du potentiel avec le pH étant la même qu'en l'absence d'urée (fig.1, p.4). Plus récemment, Colson-Guastalla [6] a montré un effet semblable de l'urée sur le potentiel du système hémoglobine-méthémoglobine humaine. A la différence de Taylor, cet auteur n'a pu opérer par titrage en milieu urée 4 M, à cause de l'évolution de la méthémoglobine humaine dans ce milieu. Pourtant, en employant une méthode cinétique, il a montré notamment que l'abaissement du potentiel d'oxydoréduction du système hémoglobine-méthémoglobine en présence d'urée de concentration inférieure à 4 M est un phénomène immédiat et réversible vis-à-vis des variations de concentration en urée, et qu'une variation de température agit sensiblement sur cet abaissement.

En travaillant avec l'hémoglobine de cheval, nous avons retrouvé

les résultats de Taylor en ce qui concerne l'effet de l'urée 4 M sur le potentiel d'oxydoréduction du système. En outre, une série de titrages effectués en présence d'urée 2 M fait ressortir un effet semblable, quoique de moindre importance.

3. Effet de la température sur la modification du potentiel (ΔE).

La modification du potentiel (ΔE) que subit le système oxydoréducteur est liée à la variation d'énergie libre qui accompagne l'ensemble des modifications chimiques apportées par l'urée sur les formes réduite et oxydée.

On peut écrire

$$\Delta F = \Delta F_1 - \Delta F_2 = \mathcal{F}(E'_0 - E'_{0.u}) = \mathcal{F} \cdot \Delta E$$

où E'_0 = potentiel d'oxydoréduction en l'absence d'urée,

$E'_{0.u}$ = potentiel d'oxydoréduction en présence d'urée,

ΔF_1 = variation d'énergie libre correspondant à l'action de l'urée sur l'hémoglobine (renfermant 1 atome-gramme de fer),

ΔF_2 = variation d'énergie libre correspondant à l'action de l'urée sur la méthémoglobine (1 atome-gramme de fer).

La connaissance de la variation de ΔE avec la température, soit $\delta \Delta E / \delta T$, permet donc d'atteindre la différence des variations d'entropie ($\Delta S_1 - \Delta S_2 = - \delta(\Delta F_1 - \Delta F_2) / \delta T = -\mathcal{F} \cdot \delta \Delta E / \delta T$).

Colson-Guastalla [6] a déterminé expérimentalement l'effet d'une variation de température sur ΔE dans le cas du système hémoglobine-méthémoglobine humaine. Elle signale un effet sensible, ce qui indique une différence notable entre les variations d'entropie correspondant à l'action de l'urée sur l'hémoglobine et la méthémoglobine respectivement

(14 cal/degré/mol environ).

Nous avons entrepris des expériences analogues avec le système hémoglobine-méthémoglobine de cheval; nous trouvons un effet semblable et sensiblement égal (16 cal/degré/mol environ).

4. Nature instantanée de l'action de l'urée sur le potentiel d'oxydoréduction.

La méthémoglobine de cheval peut accuser une lente évolution en présence d'urée 4 M à 30°C, plus ou moins rapide selon le pH. Dans ces conditions il s'agit d'une évolution qui correspond spectralement à la transformation lente d'une forme spectrale initiale en une forme spectrale finale unique: lors de l'évolution la courbe spectrale présente des points fixes. Le caractère simple d'une telle modification a été dégagé par Colson-Guastalla qui en a recueilli des données cinétiques et énergétiques relatives à la transformation de la méthémoglobine humaine.

La méthémoglobine de cheval est moins fragile que la méthémoglobine humaine vis-à-vis de l'action de l'urée 4 M. La figure 2 donne un aperçu de la cinétique de cette transformation pour la méthémoglobine de cheval en présence d'urée à des taux différents, notamment 4 M, 4,5 M et 6 M, à 30°C et à pH 6,5; à partir des données d'absorption à 630 mμ, 540 mμ et 500 mμ, on peut mesurer à chaque instant la concentration de la forme initiale restante, d'où la vitesse d'évolution; dans la figure 2 on a porté, en fonction du temps, les valeurs du logarithme du rapport des concentrations en forme initiale à un instant donné et à l'instant zéro.

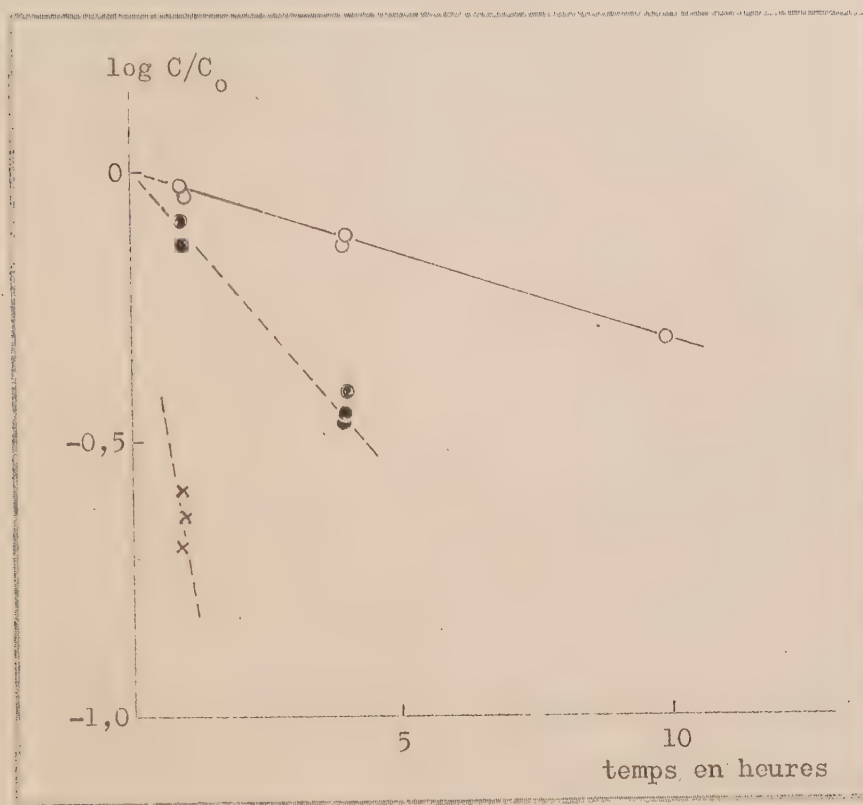


Figure 2. Vitesse de disparition de la forme spectrale initiale de méthémoglobine de cheval en présence d'urée 4,0, 4,5 et 6,0 molaire à 30°C, pH 6,5, d'après les données d'absorption à 630, 540 et 500 mμ. Méthémoglobine $5 \cdot 10^{-5}$ M.

En ordonnées: $\log C/C_0$, C étant la concentration de la forme initiale restante.

En abscisses: temps en heures.

○ urée 4 M ; ● urée 4,5 M ; x urée 6 M.

On constate d'après les résultats, qu'en présence d'urée 4 M, on se trouve en dessous de la concentration pour laquelle la vitesse d'évolution devient importante et croît rapidement en fonction du taux d'urée. En présence d'un taux inférieur, par exemple 2 M, la vitesse est infiniment petite. Or, il y a un abaissement important du potentiel provoqué par la présence d'urée 2 M. De même, la vitesse d'évolution en présence d'urée 4 M est tellement faible qu'à peine 10 % de la forme initiale sont transformés au bout d'une heure; on observe d'ailleurs que pour un taux donné de réduction le potentiel n'évolue guère sensiblement.

Ces considérations laissent croire que la modification du potentiel d'oxydoréduction par l'urée, bien qu'on l'enregistre dans des conditions où peut s'amorcer la transformation lente de la méthémoglobine par l'urée, est un phénomène immédiat, et se produit en dehors de toute transformation dénaturante.

* *
*

B. Recherches en vue de localiser l'action primaire de l'urée.

Nous nous sommes proposé dans cette partie de notre étude de chercher si l'action immédiate de l'urée sur le système hémoglobine-méthémoglobine peut être localisée au système oxydoréducteur constitué par les groupes prosthétiques, c'est-à-dire la ferro- et la ferrihémine. Nous nous sommes servi, comme modèles simplifiés, de quelques systèmes comprenant la ferro- et la ferrihémine complexée aux bases azotées.

1. Intérêt de l'étude des complexes hémine-bases azotées.

Depuis les travaux de Conant [7] il est de plus en plus courant de considérer que l'hémine, dans la molécule d'hémoglobine, est liée à la partie globine par deux groupements imidazole. D'après les hypothèses récentes [5,21,38-40] on conçoit que la liaison hémine-globine intéresse un de ces groupes situé dans la proximité de l'atome de fer (groupement proximal), l'autre, pour des raisons stériques, se trouvant plus éloigné (groupement distal). La fixation d'une molécule d'oxygène sur le fer agit différemment sur les ionisations de ces deux groupes. Tandis que celle du groupement distal est relativement peu touchée, l'acidité du groupe proximal se trouve renforcée [23,24], le pK étant abaissé de 1,0 à 1,3 unité, ce qui entraîne une acidité de l'oxyhémoglobine plus grande que celle de l'hémoglobine. Ces considérations expliquent de façon plus ou moins satisfaisante quelques propriétés de l'hémoglobine, mais on ignore encore la nature précise des liaisons fer-imidazole. D'après les données magnétochimiques de Pauling et ses collaborateurs [14,31], ces liaisons fer-imidazole sont de nature électrostatique dans l'hémoglobine et la méthémoglobine; la combinaison de l'hémoglobine avec l'oxygène ou l'oxyde de carbone provoque un profond remaniement dans la répartition des électrons de sorte que ces mêmes liaisons deviennent covalentes.

Une famille de composés qui se rapproche de l'hémoglobine est constituée par les complexes de l'hémine et de diverses bases azotées. Ces composés sont caractérisés par leur spectre d'absorption; ils ont fait l'objet de diverses études. La nomenclature en est sortie confuse; on

relève parmi d'autres les noms d'hémichrome et d'hémochrome [27] suivant l'état d'oxydation du fer dans l'hémine. La réduction du complexe à l'état oxydé (hémichrome) par divers agents (hydrosulfite de sodium, Ti^{+++} , etc.) donne l'hémochrome au spectre très caractéristique.

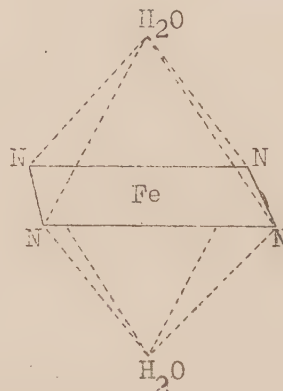
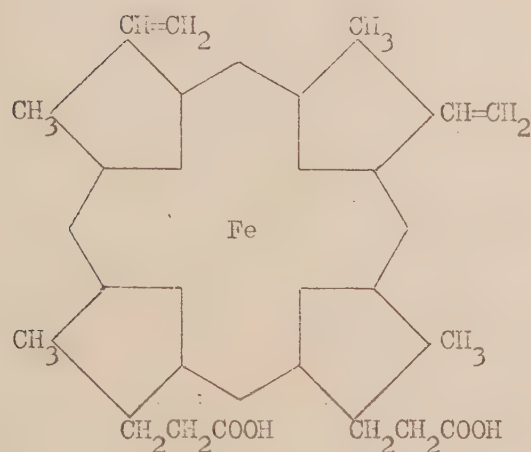
L'intérêt que l'on porte aux composés de l'hémine avec des bases azotées remonte à une date antérieure à l'époque où l'on commençait à postuler l'importance de l'histidine dans la liaisons hémine-globine. L'hémichrome de pyridine a été préparée à l'état cristallin en 1910 [25,41] et des données nombreuses ont été recueillies sur d'autres corps analogues bien avant l'hypothèse de Conant sur l'importance du groupe imidazole dans la liaison de l'hémine à la globine. De nombreux travaux plus récents de Clark et ses collaborateurs [4,15] et de Drabkin et al. [17], parmi d'autres, ont fourni des précisions utiles sur les propriétés spectrales et les structures stoechiométriques de ces composés. Ces mêmes travaux font ressortir des difficultés à formuler les équilibres en termes simples. De nombreux paramètres y entrent en jeu, tels que l'ionisation acide-base de l'hémine, l'ionisation acide-base du corps complexant, l'état d'agrégation de l'hémine en solution, etc.

2. L'hémine: structure, ionisations.

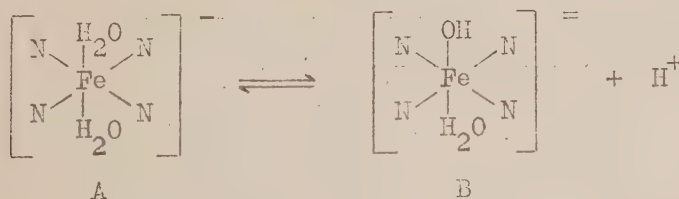
Les travaux de Fischer et ses collaborateurs [20] en particulier ont abouti à la synthèse chimique de l'hémine et à une connaissance complète de sa structure.

On représente l'hémine comme constituée par la conjugaison d'un atome de fer avec une molécule de protoporphyrine, le fer étant entouré

par les quatre atomes d'azote provenant des noyaux pyrroliques dans la molécule de porphyrine. La structure plane de la protoporphyrine est conservée.



Les quatre atomes d'azote ayant été coordonnés avec le fer dans le plan de la molécule de porphyrine, il reste deux places vides dans le diagramme octaédrique de coordination du fer perpendiculairement à ce plan, et de part et d'autre. Ces deux places sont occupées dans les corps dits hémichromes et hémochromes par deux molécules de base azotée. En solution aqueuse l'hémine peut exister soit dans la forme A, soit dans la forme B, soit comme un mélange des deux formes A et B; les formes A et B correspondent respectivement à la forme acide conjuguée et à la forme basique d'une ionisation:



Shack et Clark [32] ont étudié cette transformation et trouvent le pK correspondant à 7,6.

Les données magnétochimiques peuvent conduire à une appréciation de la nature des liaisons qui unissent l'atome de fer à la partie porphyrrique. Pauling et Coryell [30] ont trouvé pour l'hémine, cristalline ou dissoute dans la soude, une valeur de moment magnétique qui correspond à 5 électrons impairs. De même, la ferrohémine, selon les données magnétiques, contient 4 électrons impairs comme l'ion ferreux. Ces considérations ont amené les auteurs à conclure que dans l'hémine et la ferrohémine, l'atome de fer se comporte essentiellement comme un ion, et que les liaisons qui unissent le fer aux quatre atomes d'azote sont de nature électrostatique.

L'étude du potentiel d'oxydoréduction du système ferri-ferrohémine s'avère difficile. Ces corps sont peu électroactifs, difficulté que l'on surmonte en travaillant en présence de faibles quantités d'un colorant électroactif comme intermédiaire. Leur manque de solubilité impose des restrictions sérieuses, de sorte qu'on ne dispose pas d'une gamme de concentrations étendue. Au dessous de pH 7,0, la solubilité décroît brusquement, et toute mesure dans cette zone de pH est entachée d'incertitude. La complexité est accrue par la présence en solution, à tout pH, d'agglomérats.

3. Système oxydoréducteur hémine réduite et oxydée, seules et en présence d'une base complexante.

Clark et ses collaborateurs [4] ont examiné de façon minutieuse les

équilibres en cause dans un système contenant la métalloporphyrine oxydée et réduite en présence d'un corps complexant ces deux formes. Nous allons en rappeler quelques points essentiels.

Soit, une métalloporphyrine susceptible de se réduire réversiblement:



où O_x et R_y représentent les formes oxydée et réduite dans leurs états respectifs de polymérisation. L'équation générale d'électrode pour la réaction d'oxydoréduction devient, à un pH donné,

$$E_h = E'_o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{S_o}{S_r} \quad (2) ,$$

où S_o = concentration totale de la forme oxydée (ionisée ou non).

$$S_r = [R_y]^p$$

n = le nombre d'électrons en jeu dans la réaction d'oxydoréduction.

Quand une base azotée se complexe indépendamment avec les formes réduite et oxydée de la métalloporphyrine



on peut écrire, pour les constantes apparentes de dissociation des complexes

$$\frac{[R_y][B]^r}{[R_y B_r]} = K'_r \quad (5) ,$$

$$\frac{[O_x][B]^q}{[O_x B_q]} = K'_o \quad (6) ,$$

Nous pouvons simplifier d'emblée le développement de l'équation finale (dont nous ferons usage) en signalant quelques faits expérimentaux. L'analyse de nos courbes expérimentales de titrage d'oxydoréduction relatives à l'hémine ou aux complexes hémine-base azotée donne pour "n" une valeur égale à 1. Ce caractère monovalent de la réaction d'oxydoréduction implique l'absence de toute interaction entre les différentes unités de l'hémine que contiendrait un polymère O_x ou R_y . Une valeur de "n" supérieure à 1, fractionnaire ou non, aurait indiqué une certaine interaction stabilisatrice entre les différentes unités d'hémine, comme c'est le cas pour l'hémoglobine.

La quantité p dans l'équation (1) équivaut au rapport entre les atomes-gramme de métal par mole de la forme oxydée et celle de la forme réduite. p devient égal à 1 quand les formes oxydée et réduite sont dans le même état de polymérisation. En pratique, la symétrie d'une courbe de titrage d'oxydoréduction prouve que cette situation ($p = 1$) est réalisée. Or, c'est ce que nous avons trouvé expérimentalement.

Etant donné ces faits ($n = 1$, $p = 1$), nous pensons avoir le droit de supposer $x = y = 1$; supposition de travail qui n'implique pas qu'en réalité l'hémine oxydée ou réduite se trouve en état monomérique, mais seulement que le transfert d'électrons se fait comme si ce l'était.

Ces suppositions faites, on déduit facilement à partir des relations décrites, à 30°C, à un pH donné:

$$E_h(\text{volts}) = E'_0 + 0,06 \log \frac{S'_0}{S'_r} + 0,06 \log \frac{K'_0}{K'_R} + 0,06 \log \frac{K'_R + [B]^r}{K'_0 + [B]^q} \quad (7),$$

où E_h = potentiel d'une électrode plongée dans un mélange d'hémine et d'une base complexante,

E'_o = potentiel de demi-oxydation du système ferro-ferrihémine au même pH,

$S'_o = [O] + [OB_q]$ = somme des concentrations de la forme oxydée, libre et complexée,

$S'_r = [R] + [RB_r]$ = somme des concentrations de la forme réduite, libre et complexée,

$[B]$ = concentration de la base libre,

K'_o et K'_r ont leurs significations antérieures.

En présence d'une concentration constante de base, on a:

$$E_h = E_b + 0,06 \log \frac{S'_o}{S'_r} \quad (8).$$

Ici, E_b représente le potentiel de demi-oxydation du système hémine-base azotée, à concentration constante en base libre. Dans la plupart des cas, $[B]$ devient presque égale à la concentration totale de la base. En absence de base, $E_b = E'_o$.

La différence entre les potentiels de demi-oxydation du mélange hémine-base et de l'hémine est:

$$E_b - E'_o = 0,06 \log \frac{K'_o}{K'_r} + 0,06 \log \frac{K'_r + [B]^r}{K'_o + [B]^q} \quad (9).$$

La variation de potentiel introduite par la présence d'une base complexante à la concentration $[B]$, à un pH donné, est déterminée par la valeur des constantes de dissociation K'_o et K'_r . Dans le cas où cette concentration est très élevée vis-à-vis de K'_o et de K'_r , et lorsque chacune des molécules réduite et oxydée de la métalloporphyrine fixe un même nombre de molécules de base ($r = q$), l'équation (9) peut s'écrire

sous la forme simplifiée:

$$E_b - E'_0 = 0,06 \log \frac{K'_0}{K'_R} \quad (9a).$$

La variation de potentiel ($E_b - E'_0$) est alors déterminée par le rapport des constantes de dissociation K'_0 et K'_R . Si la base possède une affinité égale pour les formes oxydée et réduite, le potentiel est celui de l'hémine; si au contraire l'affinité de la base est plus grande pour la forme réduite, le potentiel est plus élevé et vice versa.

On peut prévoir que toute modification des conditions expérimentales qui change la valeur des constantes de dissociation K'_0 et K'_R (ou plus exactement leur rapport) doit entraîner une variation du potentiel E_b . Désignons par E_{b1} le potentiel dans ces conditions, et par K'_{01} , K'_{R1} les constantes respectives. Si le potentiel E'_0 de l'hémine n'est pas modifié, on déduit immédiatement de (9):

$$E_{b1} - E_b = \Delta E = 0,06 \log \frac{K'_{01}}{K'_{R1}} \cdot \frac{K'_R}{K'_0} \quad (10).$$

Dans le présent travail, on étudiera successivement l'effet de l'urée (a) sur le potentiel d'oxydoréduction des systèmes hémine-base azotée, (b) sur les constantes de dissociation K'_0 et K'_R : on cherchera à vérifier l'accord entre l'effet observé sur le potentiel et l'effet qui permettrait de prévoir la connaissance des variations des constantes de dissociation.

L'intérêt des modèles que nous avons choisis est de permettre l'analyse du mode d'action sur la liaison de la base et de l'hémine suivant qu'elle est oxydée ou réduite. Une telle étude soulève des difficultés en ce qui concerne les hémoprotéines; d'autre part, les effets observés

tant sur le potentiel que sur les valeurs des constantes de dissociation sont des effets globaux; en admettant que les expériences soient possibles dans le cas de l'hémoprotéine, les résultats ne pourraient permettre de localiser ces effets.

4. Etude expérimentale du potentiel d'oxydoréduction des complexes hémine-base azotée, en absence et en présence d'urée 4 M.

a) Technique.

Cette étude a été faite par titrage. Nous avons opéré par oxydation ou par réduction, dans le même vase, sur 50 cm³ de solution tamponnée (tampon borate 0,2 M), en absence d'urée comme en présence d'urée (4 M).

Le titrage par oxydation est effectué par petites étapes (10 à 15) après réduction préalable d'une solution dégazée et maintenue sous atmosphère d'argon; chacune de ces étapes correspond à un rapport différent et défini des formes oxydée et réduite. Le titrage par réduction se fait également par petites étapes à partir d'une solution maintenue sous gaz inerte; on prépare la solution réductrice (hydrosulfite de sodium) et l'on emplit la burette à l'abri de l'air (dispositif décrit par Michaelis et ses collaborateurs [28]). La concentration de la solution réductrice dans ce cas est telle qu'environ 5 cm³ suffisent pour achever le titrage. L'ensemble comprenant le vase à titrage, l'électrode de référence (calomel saturé) et le bain de KCl saturé où plongent les ponts de gélose (à KCl saturé) est maintenu dans un thermostat à eau (30°C $\pm$ 1°). On mesure la f.e.m. de la pile à l'aide d'un appareil basé sur le principe d'opposition (Radiometer), gradué en millivolts mais permettant

d'apprécier le dixième de millivolt. Dans chaque expérience on s'assure que la solution réductrice ou oxydante est préparée dans le même solvant que la solution à titrer, compte tenu du pH, de la concentration saline et de la concentration en urée. Deux électrodes de fil de platine, nettoyées à l'eau régale et grillées dans une flamme oxydante avant chaque titrage, servent à la mesure du potentiel; on ne retient leurs indications que si elles ne diffèrent pas de plus de 2 à 5 mV. Pour le calcul du potentiel par rapport à l'électrode normale à hydrogène on a pris pour E_c la valeur de 0,242 volt à 30°C [2].

b) Matériel.

Le chlorhydrate d'hémine a été préparé à partir d'hématies humaines suivant la méthode décrite par Drabkin et Austin [17]. Une recristallisation de ce produit par le procédé décrit par Fischer [19] n'a pas modifié les propriétés décrites dans ce travail.

On a préparé le chlorhydrate de mésohémine à partir du chlorhydrate d'hémine en deux étapes. On réalise d'abord la réduction en mésoporphyrine par l'hydrogène gazeux, en utilisant comme catalyseur le chlorure de palladium en présence de polyméthylméthacrylate, en solution dans l'acide formique (procédé de Cowgill et Clark [15], légèrement modifié). Ensuite on introduit le métal par la méthode de Corwin et Erdman [11].

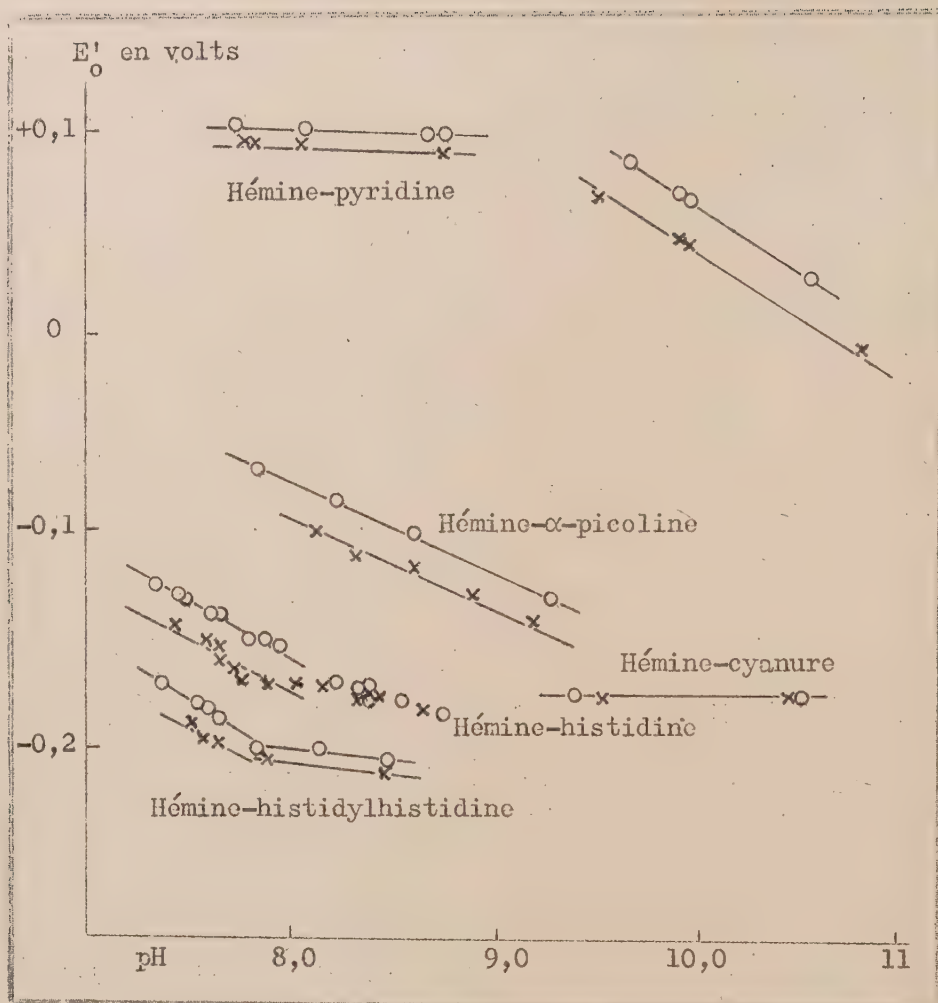
L'histidine, l'histidylhistidine sont des produits purs Hoffmann-La Roche, utilisés sans traitement supplémentaire. La pyridine utilisée est le produit R.P., Prolabo. La pilocarpine pure provenant de la même maison est vérifiée pour le contenu du groupe basique par un titrage

électrométrique contre l'acide chlorhydrique standard. L' α -picoline est le produit décrit par du laboratoire Eastman Kodak, utilisée sans traitement supplémentaire.

c) Résultats des titrages d'oxydoréduction.

L'ensemble des résultats obtenus pour l'effet de l'urée 4 M sur le potentiel d'oxydoréduction de quelques complexes hémine-bases azotées est représenté dans les figures 3, 3a (pp.22-23). Il s'agit d'hémine-histidine, hémine-histidylhistidine, hémine-pyridine, hémine- α -picoline, hémine-pilocarpine et hémine-pilocarpinate. Le complexe hémine-cyanure a été également étudié. Deux complexes de la mésohémine ont été étudiés, ceux avec l'histidine et la pyridine. On emploie une concentration de base azotée relativement très élevée par rapport à celle de l'hémine, afin que la métalloporphyrine soit complexée complètement ou presque: on suit à cet égard les indications de Barron [1], et l'on vérifie spectralement que la saturation est réalisée. Ainsi, pour une concentration 10^{-4} M en hémine, on a employé les concentrations suivantes de base: histidine 0,1 M, histidylhistidine 0,04 M, pilocarpine 0,04 M, pilocarpinate 0,08 M, pyridine 2,5 M, α -picoline 1,5 M et cyanure 0,1 M. Le pilocarpinate est préparé à partir de la pilocarpine par hydrolyse en présence de soude.

Les résultats montrent que les potentiels d'oxydoréduction de ces systèmes contenant des bases azotées sont modifiés par la présence d'urée dans certaines régions de pH; par contre, le potentiel du complexe hémine-cyanure ne l'est pas dans tout le domaine étudié. On note que la modifi-



Figures 3, 3a. Potentiel d'oxydoréduction de quelques complexes de l'hémine et de la mésohémine avec des bases azotées, en tampon et en présence d'urée 4 M.

Figure 3. Hémine-pyridine, hémine-α-picoline, hémine-histidine, hémine-histidylhistidine et hémine-cyanure.

(Hémine: 10^{-4} M; concentration du ligand dans l'ordre respectif: 2,5 M, 1,5 M, 0,1 M, 0,04 M et 0,1 M; tampon borate 0,2 M et phosphate 0,1 M. Température 30°C.)

En ordonnées: potentiel de demi-réduction en volts.

En abscisses: pH.

O potentiel en tampon.

x potentiel en tampon-urée (4 M).

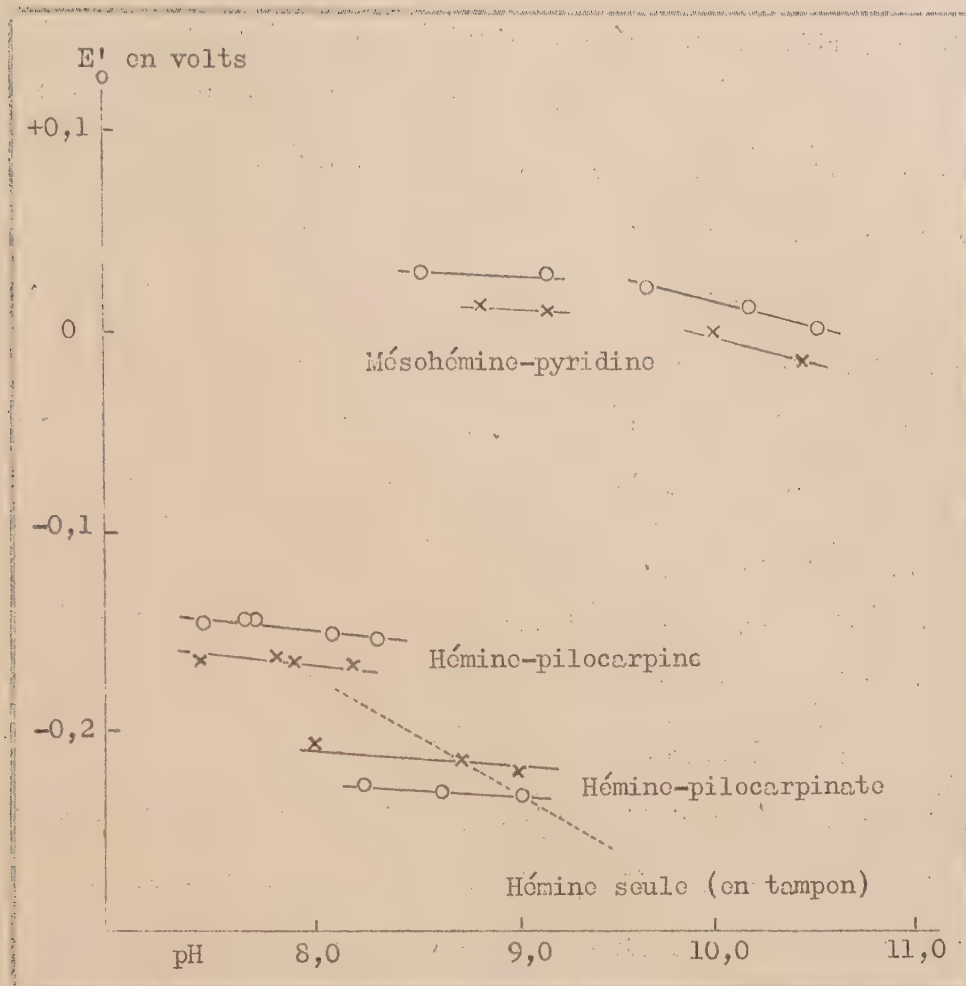


Figure 3a. Hémine-pilocarpine, hémine-pilocarpinate et mésosémine-pyridine.

(Hémine et mésosémine: 10^{-4} M; concentration du ligand dans l'ordre respectif: 0,04 M, 0,08 M et 2,5 M; tampon borate (0,2 M) et phosphate (0,1 M); température 30°C).

En ordonnées: potentiel de demi-réduction en volts.

En abscisses: pH.

O potentiel en tampon.

x potentiel en tampon-urée (4 M).

cation apportée par la présence d'urée au potentiel du système hémine-pilocarpinate est de sens opposé à celle subie par d'autres systèmes. Il est à noter également que dans le cas où la loi de variation du potentiel avec le pH est représentée par des tronçons linéaires de pentes différentes (hémine-histidine, hémine-pyridine), l'effet de l'urée (ΔE) sur le potentiel E'_0 est plus important dans la région de pH où le potentiel E'_0 varie de 60 mV par unité de pH. La modification du potentiel disparaît ou devient moins importante dans les régions où E'_0 ne varie pas ou varie moins en fonction du pH.

Ces résultats semblent indiquer que l'effet de l'urée est lié à un certain état d'ionisation des complexes étudiés.

La variation du potentiel (ΔE) apportée par l'urée permet d'évaluer la différence des variations d'énergie libre correspondant à l'action de l'urée sur les formes réduite et oxydée des complexes. La valeur de 20 mV qu'atteint ΔE dans certaines régions de pH correspond à une différence ΔF des variations d'énergie libre de 460 cal/mol.

d) Variation de ΔE avec la température.

La connaissance des variations de ΔE avec la température, soit $d\Delta E/dT$, permet d'évaluer les différences des variations d'entropie et d'enthalpie qui correspondent à l'action de l'urée sur les formes réduite et oxydée. On a cherché à mesurer directement l'effet d'une variation de température ($\delta T = \pm 20^\circ\text{C}$ entre 30°C et 10°C) sur ΔE pour quelques-uns de ces systèmes (pyridine, α -picoline, histidine, pilocarpinate). A la précision des mesures (1 à 2 mV) cet effet est nul; la différence des variations d'en-

tropie est donc nulle, et la différence des variations d'enthalpie est égale à la différence des variations d'énergie libre (460 cal/mol).

e) Remarques sur l'état d'agrégation.

Divers auteurs ont constaté que les données de diffusion et de sédimentation de l'hémine en solution peuvent conduire à des résultats très variables en ce qui concerne la masse moléculaire. Gralen [22] fournit la preuve que l'hémine en solution alcaline est polydispersée, certaines particules ayant des masses de 30 000 et même de 60 000. Shack et Clark [32] montrent qu'une petite variation de la méthode de préparation, la composition du tampon et la présence de sels peuvent avoir un effet très fort sur la masse moléculaire de l'hémine en solution. Le tableau 1 donne quelques résultats obtenus par ces auteurs à partir des données de diffusion.

Tableau 1

Masse moléculaire de l'hémine en solution,
calculée à partir des données de diffusion.

Solution	Masse moléculaire (Loi de Stokes)
0,02 N NaOH	2 700
0,02 N NaOH + NaCl 0,08 M	18 000
Tampon borate pH 9,1	35 000
Tampon borate pH 9,2	44 000
Tampon phosphate pH 11,32	98 000
Tampon phosphate pH 12,05	60 000

Toutefois, selon ces auteurs, la présence de ces agglomérats n'affecterait que dans une très faible mesure les données d'oxydoréduction, puisque les variations d'énergie qu'impliquent les processus de désagrégation et d'agrégation seraient infimes devant les variations d'énergie dues au transfert d'électron. Shack et Clark pensent que la solution contient des dimères de l'hémine ayant une certaine stabilité, les gros agglomérats étant formés par des unités plus ou moins nombreuses de ces dimères. Les unités dimérisées peuvent ou non être dissociées par l'addition d'un corps complexant selon les conditions; on sait que la coupure se fait lors de l'addition de l'ion cyanure ou de la pyridine au milieu neutre. D'autre part, en solution alcaline, la structure dimérisée de l'hémine est conservée toutefois après complexion avec la pyridine, à raison de deux molécules de pyridine par molécule d'hémine.

Lors des titrages d'oxydoréduction, nous avons pu observer la présence d'agglomérats aussi bien dans une solution d'hémine que dans quelques complexes hémine-base azotée. Dans un titrage par oxydation progressive d'une solution de l'hémine préalablement réduite, on s'aperçoit que la quantité d'agent oxydant ajoutée (ici l'ion ferricyanure) n'atteint presque jamais la valeur stoechiométrique. Par exemple, le titrage de 50 cm³ d'une solution d'hémine 10⁻⁴ M exige 3 à 4 cm³ de ferricyanure 10⁻³ M, alors que l'on s'attendrait à un volume de 5 cm³ dans le cas théorique d'une oxydation atome de fer à atome de fer. Ceci n'est pas dû à quelque impureté dans l'échantillon d'hémine utilisé. Cinq échantillons d'hémine préparée selon le procédé de Drabkin et Austin (loc.cit.), recristallisée une ou deux fois donnaient le même résultat, aussi bien

qu'un produit du commerce (Hoffmann-La Roche). Le dosage de fer par un procédé classique [26] dans tous ces échantillons de l'hémine donnait le chiffre attendu (3,5 %) aux erreurs expérimentales près. La présence de cristaux d'hémine non dissous est écartée par le fait que la centrifugation des solutions d'hémine à 144 000 g pendant 40 minutes n'agit pas sur le résultat des titrages d'oxydoréduction.

Ces données nous semblent montrer qu'une solution parfaitement limpide d'hémine peut contenir des agglomérats enfermant les molécules d'hémine d'une façon telle que le noyau de fer d'un certain nombre de molécules soit inaccessible aux agents réducteurs et oxydants. Ce nombre peut varier suivant la méthode de préparation et peut atteindre 20 à 30 % du nombre total des molécules.

Les données d'un titrage d'oxydoréduction ne sont valables que si les mesures de potentiel correspondent aux formes oxydée et réduite en état d'équilibre. La présence des agglomérats peut introduire une erreur sur la valeur du potentiel pour un taux donné d'oxydation, si ces agglomérats sont susceptibles de lâcher progressivement les monomères. Autrement dit, si les agglomérats sont en équilibre avec les monomères, et si la vitesse de dépolymérisation est appréciable devant le temps consacré à un titrage, on risque d'introduire des erreurs. Or, notre expérience montre qu'il n'en est pas ainsi. Pour un taux donné d'oxydation, le potentiel de l'électrode se stabilise progressivement, et une fois atteint, le potentiel demeure stable pendant dix à quinze minutes, ce qui est raisonnable étant donnés les autres risques de variation.

Des expériences par la méthode spectrale ont apporté la preuve

supplémentaire que les gros agglomérats demeurent en dehors des réactions d'oxydoréduction ou de complexion que peuvent subir les monomères (ou dimères). Ces expériences consistent à montrer que la quantité du complexe ferrohémine-base (pilocarpinate) que l'on produit à partir d'une concentration apparente donnée de l'hémine (oxydée) est la même suivant que l'hémine réduite est complexée à la base immédiatement ou après un long séjour dans des conditions où la dépolymérisation des agglomérats aurait pu progresser.

Expérience.

On emploie des tubes de Thunberg à deux compartiments présentant des faces optiques parallèles (4 x 1 cm) distantes de 1 cm. On met 2 cm³ d'une solution tamponnée d'hémine ($5 \cdot 10^{-5}$ M) dans le compartiment principal du tube; le compartiment supérieur renferme 2 cm³ d'une solution de pilocarpinate (0,16 M) également tamponnée. On emplit le tube d'argon par vidage et remplissage successifs, trois fois de suite; cela débarrasse les solutions de l'oxygène dissous. On réduit la solution d'hémine en introduisant une petite quantité d'hydrosulfite de sodium solide; on fait ensuite le vide. On mélange le contenu des deux compartiments du tube; il se forme une solution de pilocarpinate de ferrohémine contenant un rapport donné d'hémine et de pilocarpinate à un pH connu; on connaît en outre le pH auquel l'hémine a été réduite. On peut ainsi préparer des solutions de pilocarpinate de ferrohémine contenant le même rapport de pilocarpinate et d'hémine, au même pH final, mais pour lesquelles la

réduction de l'hémine a été réalisée dans des conditions différentes de pH. On a ainsi préparé deux solutions de pilocarpinate de ferrohémine, toutes deux à pH 9,1, dont l'une est formée à partir d'hémine réduite en solution tamponnée (pH 9,1) suivie de complexion par le pilocarpinate au même pH, et l'autre par la réduction de l'hémine en solution alcaline (0,1 M NaOH) suivie du mélange avec le pilocarpinate additionné d'un excès calculé de borate.

Des mesures de densité optique à 558 mμ et 542 mμ permettent d'évaluer la concentration de pilocarpinate de ferrohémine produit en chaque cas. On constate d'après le tableau 2 que les densités optiques des produits finaux sont d'autant plus grandes que le pH de la solution où la réduction de l'hémine a été effectuée est plus élevé. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Shack et Clark, qui indiquent une dispersion plus grande de l'hémine en solution alcaline.

On voit également qu'un séjour de l'hémine à l'état réduit pendant une période de 90 minutes (temps généralement requis pour un titrage d'oxydoréduction) n'a pas d'effet sensible sur la quantité de pilocarpinate de ferrohémine formé en chaque cas. On peut donc penser, bien que les agglomérats de l'hémine existent dans une solution préparée selon les méthodes courantes, que leur seule présence n'affecte pas sensiblement la valeur du potentiel d'oxydoréduction.

Tableau 2

Variation de densité optique d'une solution de pilocarpinate de ferrohémine avec la méthode de préparation.

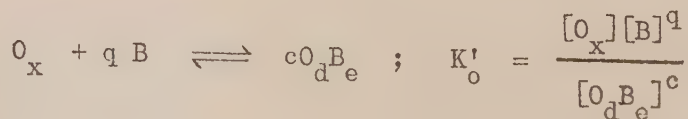
Milieu où l'hémine est réduite	pH final du produit	Complexion avec le pilocarpinate <u>immédiatement</u> après réduction de l'hémine			Complexion avec le pilocarpinate <u>90 minutes</u> après réduction de l'hémine		
		Densité optique		Rapport	Densité optique		Rapport
		558 mμ	542 mμ	(a)/(b)	558 mμ	542 mμ	(a)/(b)
		(a)	(b)		(a)	(b)	
Tampon borate 0,1 M, pH 7,9	7,9	0,584	0,224	2,6	0,542	0,218	2,49
Tampon borate 0,1 M, pH 9,1	9,1	0,616	0,232	2,66	0,610	0,230	2,65
Soude 0,1 M	9,1	0,656	0,229	2,86	0,646	0,236	2,74

La concentration finale de l'hémine et celle du pilocarpinate sont de $2,5 \cdot 10^{-5}$ M et 0,08 M respectivement dans tous les cas.

5. Détermination expérimentale des constantes de dissociation en l'absence et en présence d'urée 4 M.

a) Formule stoechiométrique du complexe.

Pour une réaction du type hémine-base azotée, à un pH donné, on peut écrire



où $x = cd$; $q = ce$.

Considérons d'abord l'équation ci-dessus qui intéresse seulement le complexe ferrihémimine-base. Si l'on définit

$$S_m = x [O_x] + d [O_d B_e] = \text{concentration totale de la métalloporphyrine, complexée ou non,}$$

$$S_b = \text{concentration totale de la base,}$$

$$\beta = \frac{d [O_d B_e]}{S_m} = \text{fraction de la métalloporphyrine transformée,}$$

on peut déduire, à partir de ces relations, et en admettant $S_b \cong [B]$ (supposition qui se justifie largement étant donné la concentration relativement très élevée de base que l'on utilise, vis-à-vis de la concentration en hémimine)

$$\frac{(1-\beta)S_m}{\beta^c S_m^c} = \frac{x \cdot K'_0}{d^c S_b^q}.$$

A concentration totale constante de la métalloporphyrine, on a

$$\frac{1-\beta}{\beta^c} = \frac{A}{S_b^q} \quad (11)$$

où A est une constante.

Cette relation permet, à partir des valeurs expérimentales de β , de trouver les valeurs appropriées de c et q correspondant aux conditions expérimentales. En d'autres termes, elle permet de préciser, à un pH donné, la formule stoechiométrique du complexe.

Nous avons appliqué cette méthode de Cowgill et Clark [15] pour trouver une formule appropriée pour le complexe hémimine-pilocarpinate.

Les spectres d'absorption de l'hémimine et des complexes hémimine-base azotée sont différents, ce qui permet de déterminer, par spectrophotométrie, les courbes d'association des systèmes hémimine-base azotée.

Soit D_0 la densité optique d'une solution donnée de l'hémine en l'absence de base,

D la densité optique en présence de base à la concentration S_B ,

D_2 la densité optique quand la métalloporphyrine est saturée par la base: on obtient cette valeur par extrapolation.

Ces densités mesurées se rapportent à une longueur d'onde convenablement choisie dans chaque cas considéré.

$$\text{On a} \quad \beta = \frac{D - D_0}{D_2 - D_0}$$

Le travail expérimental consiste essentiellement à construire les courbes d'association dans des conditions données de pH, température et composition du milieu.

Ces expériences ont été faites plus souvent avec le pilocarpinate qu'avec d'autres bases. Le choix du pilocarpinate se justifie pour diverses raisons. A la différence de l'histidine, le pilocarpinate ne contient qu'un seul groupe basique capable de coordonner. L'affinité de cette base pour la ferri- et la ferrohémine est telle que la marge des concentrations en base (S_B) devient convenable. La pyridine, et à un moindre degré l' α -picoline ont une affinité faible pour la ferrihémine, de sorte que la construction des courbes d'association (β en fonction de $\log S_B$) est marquée d'incertitude; une concentration fort élevée de la base est requise pour approcher la saturation de l'hémine, le milieu thermodynamique en est modifié. Ce qui est plus important, les expériences exploratives montrent que l'allure de la courbe β en fonction de $\log S_B$ (pilocarpinate) correspond à deux molécules de base par molécule d'hémine dans tout le domaine de pH étudié. Il en est de même pour l'hémine en état oxydé et réduit, en absence et présence d'urée, alcool et dioxane. Cette

condition n'est pas toujours remplie par d'autres bases, notamment l'imidazole et l' α -picoline.

Technique.

On opère en solution tamponnée, pH compris entre 8,2 et 9,6, en tampon borate 0,1 M, en présence et en absence d'urée. La concentration de l'hémine est de $5 \cdot 10^{-5}$ M pour toutes les mesures. La concentration de la base varie entre une concentration nulle et celle qui suffit à transformer la presque totalité de l'hémine. Pour le complexe ferrihémine pilocarpinate on mesure la densité optique à 532 m μ où ce complexe présente une bande d'absorption. La forme réduite montre deux bandes aigües à 542 et 558 m μ ; on se place alors sur ces deux longueurs d'onde. Pour la forme réduite, on réduit 2 cm³ d'une solution de la forme oxydée, dans la cuve optique, par 0,02 cm³ d'une solution tamponnée d'hydrosulfite de sodium sous une couche d'huile de paraffine, ce qui empêche la réoxydation par l'oxygène pendant les mesures.

On porte les valeurs de β (calculées à partir des données d'absorption) en ordonnées contre le logarithme de la concentration de base en abscisses. Les points expérimentaux se trouvent sur une courbe en S bien symétrique qui répond à l'équation $O + 2 B \rightleftharpoons OB_2$.

Nos résultats (figure 4, p.34) montrent qu'il s'agit bien d'un complexe du type OB_2 , c'est-à-dire deux molécules de pilocarpinate par molécule d'hémine. Les points expérimentaux s'assimilent plutôt à la courbe (2) qu'à la courbe (3). Cela permet de dire que dans les conditions expérimentales le complexe hémine-pilocarpinate répond à la formule OB_2 plutôt

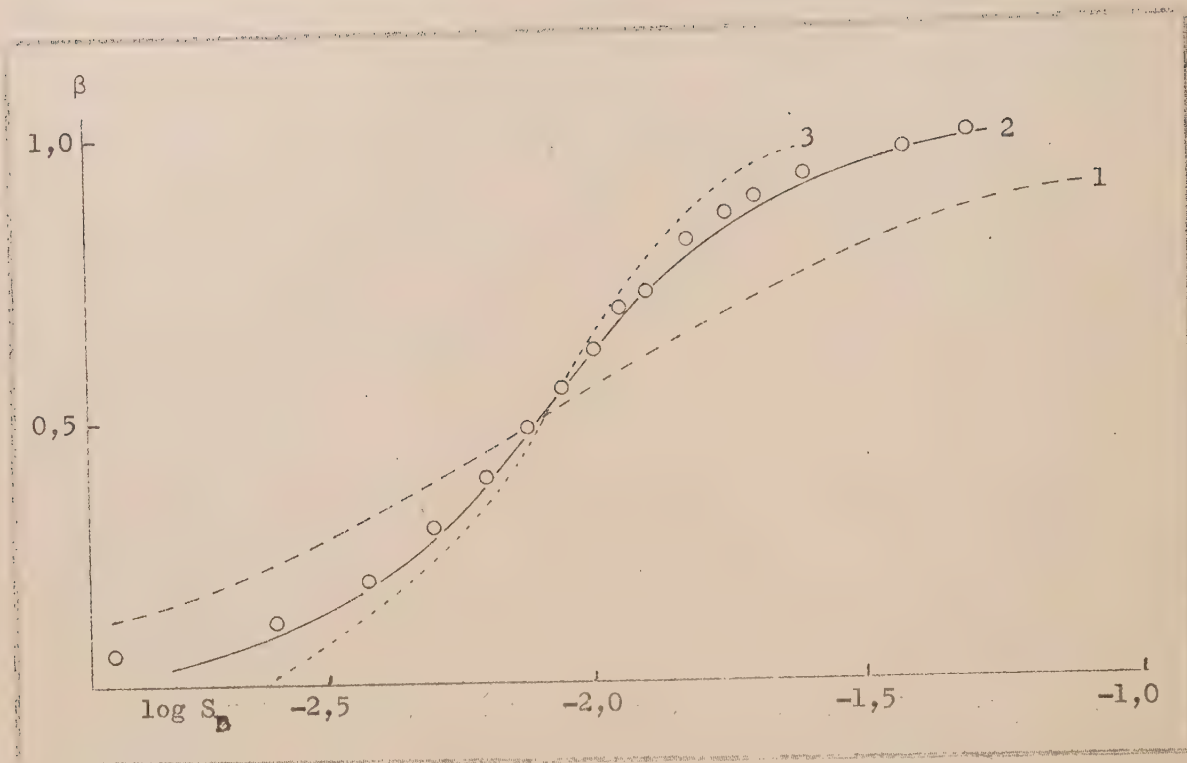


Figure 4. Association entre l'hémine et le pilocarpinate.

Tampon borate 0,1 M; pH 8,2; température 20-21°C.
Hémine $5 \cdot 10^{-5}$ M.

En ordonnées: β , c'est-à-dire la fraction d'hémine complexée.
En abscisses: $\log S_B$, logarithme de la concentration en pilocarpinate.

○ points expérimentaux.

Courbe (1) en trait interrompu, calculée selon la relation:

$$\log \frac{\beta}{1-\beta} = 2,085 + \log S_B; \text{ soit } c = q = 1 \text{ dans l'équation (11).}$$

Courbe (2) en trait plein calculée selon la relation:

$$\log \frac{\beta}{1-\beta} = 4,17 + 2 \log S_B; \text{ soit } c = 1, q = 2 \text{ dans l'équation (11).}$$

Courbe (3) en trait pointillé, calculée selon la relation:

$$\log \frac{\beta^2}{1-\beta} = 8,04 + 4 \log S_B; \text{ soit } c = 2, q = 4 \text{ dans l'équation (11).}$$

qu'à la formule O_2B_4 .

Des expériences analogues en présence d'urée 4 M montrent que la réaction se fait suivant le même schéma dans ces conditions.

On a étudié par la même technique la complexion de l'hémine réduite avec le pilocarpinate, en tampon seul et en présence d'urée. On relève partout un complexe décrit par la formule RB_2 .

b) Détermination des constantes de dissociation.

Ces résultats ayant permis de préciser les formules stoechiométriques des complexes, on peut procéder à la détermination des constantes de dissociation K'_0 et K'_1 en l'absence et en présence d'urée.

La réaction de la ferrihémine avec la base, à un pH donné, peut s'écrire:



$$K'_0 = \frac{[O][B]^2}{[OB_2]}$$

$$\log K'_0 = \log \frac{[O]}{[OB_2]} + 2 \log [B]$$

Lorsque la ferrihémine est saturée à 50 % ($\beta = 0,5$), on a

$$[O] = [OB_2]$$

$$[B] = [l] - [OB_2]$$

où $[l] = S_{B\ 95}$ = concentration de base nécessaire pour saturer la ferrihémine initiale à 50 %.

Puisque $[l]$ est beaucoup plus grande que $[OB_2]$, on peut écrire

$$[B] = S_{B\ 0,5}$$

on en déduit:

$$\log K'_O = 2 \log S_{B\ 0,5} \quad \dots\dots \quad (m)$$

On a également pour la forme réduite

$$\log K'_R = 2 \log S_{B\ 0,5} \quad \dots\dots \quad (n)$$

Ces relations permettent d'atteindre les constantes de dissociation K'_O et K'_R à un pH donné par la détermination expérimentale des valeurs de $\log S_{B\ 0,5}$ dans les différents cas.

On construit les courbes d'association (β en fonction de $\log S_B$) en solution tamponnée aux différents pH, pour la ferrihémine-pilocarpinate comme pour la ferrohémine-pilocarpinate, en tampon seul et en présence d'urée 4 M. Ces courbes fournissent, dans les différents cas, les valeurs de $\log S_{B\ 0,5}$ ($\beta = 0,5$), d'où l'on calcule les constantes de dissociation appropriées.

6. Comparaison des résultats relatifs à l'effet de l'urée sur le potentiel du système hémine-pilocarpinate et sur les valeurs des constantes de dissociation.

Toute comparaison exige une étude de l'influence de l'urée sur le potentiel de l'hémine. Or, celui-ci est apparemment modifié par la présence d'urée. On trouve en effet que le potentiel d'oxydoréduction de l'hémine est abaissé de 30 mV environ en présence d'urée 4 M (figure 5). Nous pensons pouvoir interpréter entièrement cet abaissement de potentiel par l'effet complexant de l'urée vis-à-vis de l'hémine (cf.p.44).

On connaît l'affinité de l'hémine pour les groupes aminés non chargés. Or, l'urée contient, dans toute la région de pH utilisée, des

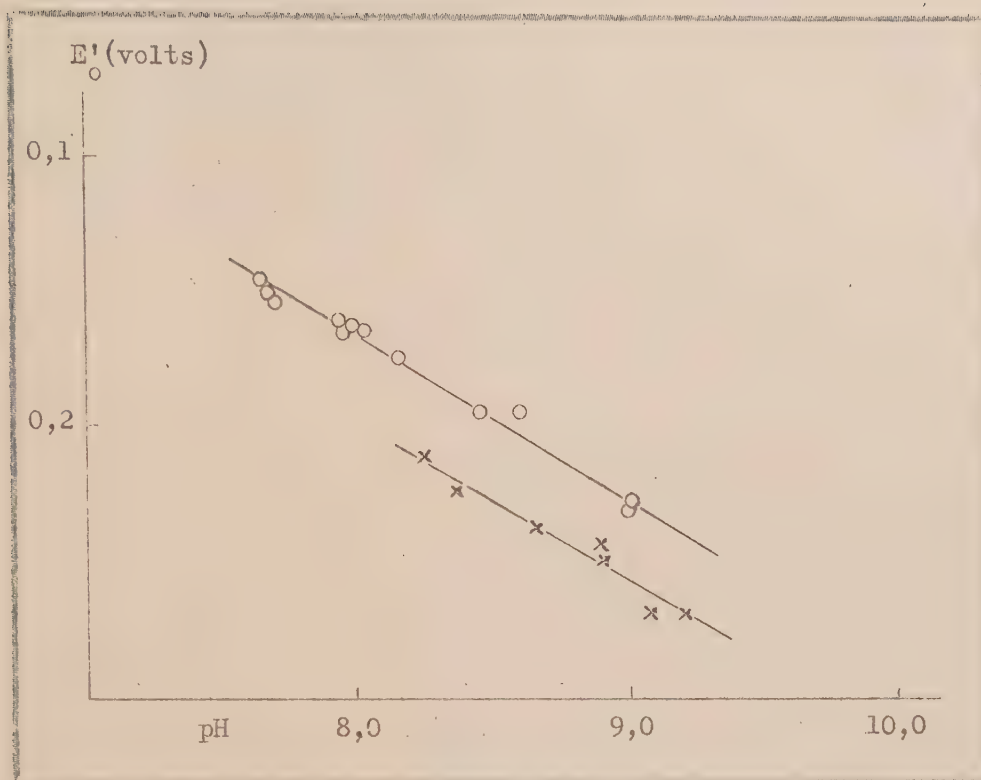


Figure 5. Modification du potentiel d'oxydoréduction du système ferri-ferrohémine par l'urée 4 M.

Hémine 10^{-4} M, urée 4 M, tampon borate 0,1 M, température 30°C.

En ordonnées: potentiel de demi-réduction.

En abscisses: pH.

O sans urée.

x en présence d'urée 4 M.

groupes aminés non chargés. Il s'imposait donc de chercher si l'urée pouvait avoir un effet complexant sur l'hémine, sous forme oxydée et réduite. L'étude spectrale de la ferrohémine en présence d'urée montre qu'il n'y en a pas dans les conditions utilisées (hémine 10^{-4} M, urée 4 M, pH entre 7,5 et 9,3). D'autre part, le spectre de la forme oxydée de l'hémine se trouve légèrement modifiée en présence d'urée (figure 6). Nous croyons avoir affaire à un effet complexant semblable à l'effet montré par les bases, mais de loin beaucoup plus faible. La saturation du milieu avec l'urée (concentration molaire en urée $> 7,5$ pour une concentration 10^{-4} M en hémine) ne suffit pas à donner un spectre final, fait qui rend impossible tout calcul d'affinité par les mesures spectrales. Nous avons donc cherché à calculer la constante de dissociation pour cette réaction (en admettant qu'il y ait une réaction d'équilibre) à partir des données potentiométriques. Ce calcul approximatif devient réalisable par le fait que c'est uniquement la forme oxydée qui est complexée. En substituant les valeurs appropriées dans l'équation (9), on aurait:

pour un complexe du type hémine-urée₂ ($q = 2$), $K_{\text{diss.}} = 7,39$

pour un complexe du type hémine-urée ($q = 1$), $K_{\text{diss.}} = 1,85$.

Nos données ne nous permettent pas de savoir si le complexe renferme une ou deux molécules d'urée par molécule d'hémine, mais l'analogie avec d'autres bases rend vraisemblable un complexe divalent ($q = 2$).

Dans cette hypothèse, la présence d'urée dans le milieu hémine pilocarpinate sera accompagnée d'une compétition entre l'urée et le pilocarpinate, vis-à-vis de la ferrihémine.

Considérons les conséquences de cette compétition. Elle intéresse

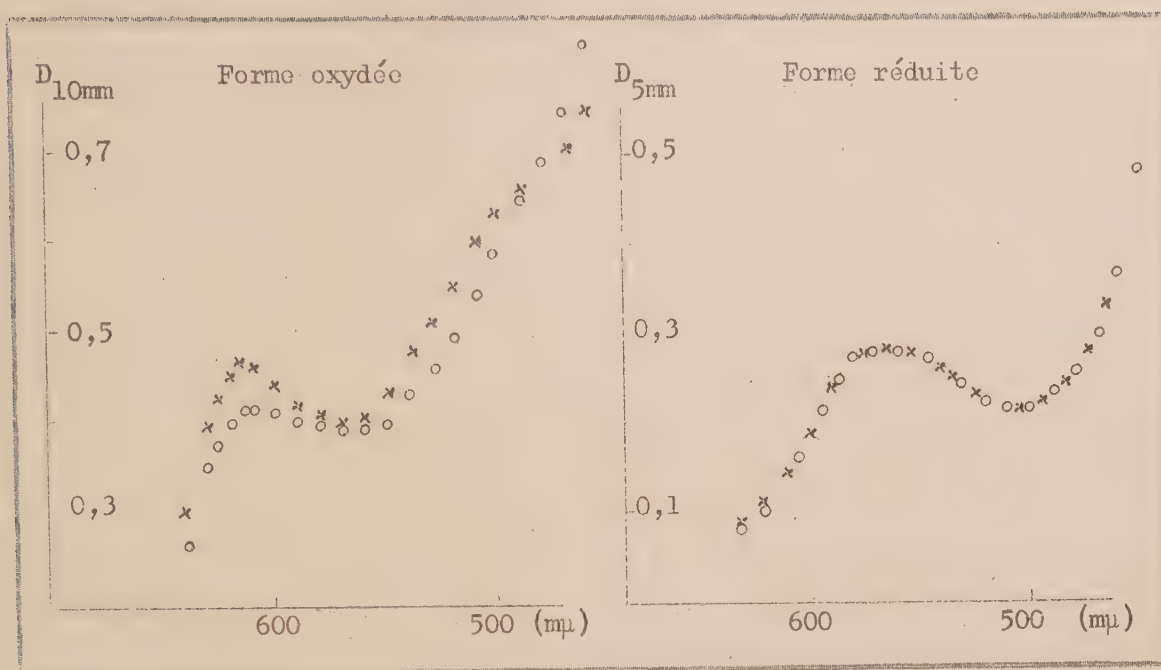


Figure 6. Spectre d'absorption de l'hémine, oxydée et réduite, entre 450 mμ et 650 mμ, en absence et en présence d'urée 4 M.

Hémine: 10^{-4} M. Tampon borate 0,1 M, pH 9,1.

Forme oxydée: D_{1cm} .

Forme réduite (réduction par l'hydrosulfite de sodium sous paraffine): D_{5mm} .

En ordonnées: densité optique.

En abscisses: longueur d'onde.

○ en tampon.

x en tampon + urée 4 M.

uniquement la forme oxydée de l'hémine.

Quand c'est uniquement la base qui complexe l'hémine, S'_0 , somme des concentrations de l'hémine libre et complexée, est décrite par la relation:

$$S'_0 = [O] + [OB_2] \quad (a)$$

En présence d'urée, on peut écrire, en tenant compte de l'action complexante de l'urée et en admettant que le complexe de l'hémine et de l'urée est divalent,

$$S'_0 = [O] + [OB_2] + [OU_2] \quad (b)$$

$$S'_0 = [O] + \frac{[O][B]^2}{K'_0} + \frac{[O][U]^2}{K'_u},$$

$$S'_0 = [O] \left\{ 1 + \frac{[B]^2}{K'_0} + \frac{[U]^2}{K'_u} \right\} \quad (c)$$

où

$$K'_u = \frac{[O][U]^2}{[OU_2]}.$$

La substitution des valeurs appropriées de $[B]$, $[U]$, K'_0 et K'_u dans l'équation (c) permet de calculer la concentration du complexe OU_2 dans le mélange. Elle ne représente qu'environ 3 % du total. La partie d'hémine oxydée complexée à l'urée est donc négligeable par rapport à la quantité complexée au pilocarpinate. Donc l'on se trouve en droit d'appliquer les équations (9) et (9a) en ce qui concerne la variation du potentiel introduite par la présence d'une base complexante, les constantes K'_0 et K'_R étant remplacées par K'_{01} et K'_{R1} (les constantes apparentes en présence d'urée).

La substitution des valeurs expérimentales des constantes de dissociation (complexe réduit et oxydé), en l'absence et en présence d'urée dans l'équation (10) aboutit aux ΔE calculés correspondants.

On a ainsi, en solution d'urée 4 M, d'après les valeurs de $\log S_{B,5}$ à 20°C,

$$\begin{aligned}\Delta E \text{ calculé} &= 14,5 \text{ mV à pH } 8,2 \\ &= 14,5 \text{ mV à pH } 9,0\end{aligned}$$

alors que la détermination expérimentale directe de ΔE donne, aux mêmes pH (figure 3a, p.23)

$$\begin{aligned}\Delta E \text{ exp.} &= 16,0 \text{ mV à pH } 8,2 \\ &= 14,0 \text{ mV à pH } 9,0.\end{aligned}$$

Rappel de l'ordre de précision. L'erreur expérimentale dans la détermination des constantes de dissociation est due principalement à l'erreur dans le repérage du point de demi-saturation de l'hémine par la base ($\beta = 0,5$) sur les courbes d'association. La densité optique correspondant à 100 % de saturation ne peut être connue avec une précision plus grande que 4 % (on obtient cette valeur par extrapolation). On peut accuser de ce fait une erreur d'environ $\pm 0,01$ sur la valeur de $\log S_{B,0,5}$, donc de $\pm 0,02$ sur $\log K'_O$ et $\log K'_R$. A cela peut s'ajouter l'erreur habituelle de pipetage. On a tenu à minimiser cette erreur dans le pipetage de l'hémine en se servant d'une pipette à écoulement constant, dite de Linderström-Lang. Une erreur de $\pm 0,02$ à $\pm 0,025$ sur $\log K'_O$ et $\log K'_R$ correspond à une erreur de ± 2 à 3 mV sur la valeur de ΔE calculé.

Etant donné l'ordre de précision, les valeurs calculées de ΔE en solution d'urée 4 M sont en bon accord avec les résultats expérimentaux.

directs.

Cet accord justifie précisément l'hypothèse suivant laquelle l'effet de l'urée sur le potentiel de l'hémine s'expliquerait strictement par l'effet de complexion de l'urée.

7. Discussion sur le mécanisme de l'action de l'urée.

Les résultats présentés ci-dessus ont permis d'analyser la variation globale apportée par l'urée au potentiel d'oxydoréduction: on a en effet déterminé la variation des constantes de dissociation apparentes des complexes, pour la forme réduite et pour la forme oxydée. Il est possible maintenant de pousser plus loin l'analyse du mécanisme de l'action de l'urée en recherchant quels équilibres interviennent dans l'association base azotée-hémine, réduite ou oxydée.

Dans un système contenant une métalloporphyrine et une base coordinante, on peut envisager plusieurs types de réaction.

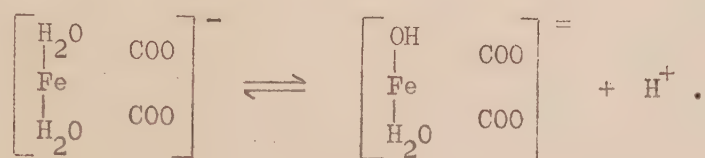
1) L'association réversible entre l'ion du métal réduit et la porphyrine:



Les méthodes courantes de préparation de métalloporphyrine à partir du métal et de la porphyrine mettent en jeu cette réaction. D'après l'expérience, en solution aqueuse, l'équilibre est toujours fortement dirigé vers la droite. Notons également que la preuve a été fournie que cette association du métal à la porphyrine se fait par l'intermédiaire des atomes d'azote pyrrolique, et toute participation des carboxyles de la protoporphyrine est exclue.

2) L'oxydation et la réduction réversible de la métalloporphyrine par perte ou gain d'un électron par le noyau métallique.

3) L'ionisation réversible du type acide-base subie par la métalloporphyrine à l'état oxydé. Il est courant de penser que cette ionisation intéresse une molécule d'eau coordonnée au fer (les groupements carboxyliques de la partie porphyrique s'ionisent dans une région de pH beaucoup plus acide):



4) L'association réversible entre la métalloporphyrine oxydée et la base, et la métalloporphyrine réduite et la base.

5) Un processus d'agrégation (réversible ou non) de la métalloporphyrine oxydée ou réduite, et du complexe métalloporphyrine-base (oxydé ou réduit).

Les propriétés diélectriques de l'urée modifient le milieu de façon à déplacer les équilibres entre corps liés par des forces coulombiennes. La dissociation du type acide-base et celle des complexes électrostatiques se trouvent par suite modifiées. Nous allons rechercher les conséquences d'une variation de la constante diélectrique du milieu sur les équilibres décrits ci-dessus, et voir si le fait d'accroissement de la constante diélectrique du milieu par l'urée rend compte de l'effet observé. Pour cela, il s'impose également de chercher si des variations de constante diélectrique apportées par d'autres corps que l'urée donnent des effets comparables.

Il y aura lieu d'envisager d'autre part le rôle éventuel d'une variation apportée par l'urée aux coefficients d'activité.

1) Prenons d'abord les réactions



Les résultats magnétochimiques de Pauling et Coryell [30] montrent que les liaisons qui attachent l'atome de fer à la protoporphyrine dans ces deux composés sont de nature électrostatique. Si l'effet diélectrique de l'urée pouvait modifier différemment les constantes d'équilibre de ces réactions (de façon à changer le rapport des constantes), on s'attendrait à une modification du potentiel d'oxydoréduction E'_0 .

Le titrage effectué en présence d'alcool (20 %) montre que le potentiel d'oxydoréduction du système ferro-ferrihème garde la valeur mesurée en solution aqueuse au même pH. Ceci montre que le rapport des constantes d'équilibre Fe^{+++} -protoporphyrine et Fe^{++} -protoporphyrine ne peut être modifié par une variation de la constante diélectrique du milieu, même si l'on admet que l'effet diélectrique agisse sur les équilibres individuels. La modification apportée par l'urée au potentiel d'oxydoréduction de l'hème n'est donc pas due à l'augmentation de la constante diélectrique; il semble que l'on puisse l'expliquer entièrement par la complexion préférentielle de l'urée avec la ferrihème (cf. p.36).

2) Ionisation de la ferrihème.

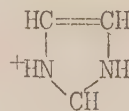
A la différence de l'équilibre décrit ci-dessus, l'ionisation acide-base de la ferrihème est susceptible d'être modifiée par une variation

de la constante diélectrique du milieu. Nous avons déterminé, par mesures spectrales, l'effet global de l'urée sur la constante d'équilibre de cette réaction.

Les mesures de densité optique sont faites à 615 mμ, sur des solutions tamponnées renfermant une concentration fixe de l'hémine, les unes en tampon phosphate ou borate ($\mu = 0,2$), les autres en même tampon en présence d'urée 4 M. Les mesures de pH sont faites sur chaque solution après les mesures spectrales. Les valeurs de densité optique portées en fonction du pH donnent une courbe typique de titrage en S, ce qui permet d'évaluer le pK' apparent d'ionisation dans chaque cas. La figure 7 (p.46) montre que le pK' de cette ionisation est en effet abaissé en présence d'urée. En solution tampon, nous retrouvons 7,6 comme pK' de cette ionisation [35] tandis qu'en urée 4 M le pK' apparent se trouve déplacé à 7,4. Précisons que le sens du déplacement du pK' est celui que laisse prévoir une augmentation de la constante diélectrique du milieu. Il est à noter que l'effet observé est global; il sera difficile de dire si le fait d'une complexion de l'hémine par l'urée joue en faveur de ce déplacement apparent, mais l'effet de l'augmentation de la constante diélectrique paraît être le plus probable.

3) Ionisation de la base.

Dans tout examen des complexes hémine-bases azotées, un élément important est constitué par la dissociation de la base complexante. Il y a des raisons de penser que la base ne peut être complexante qu'à l'état non chargé. Ainsi pour l'imidazole, la forme acide conjuguée



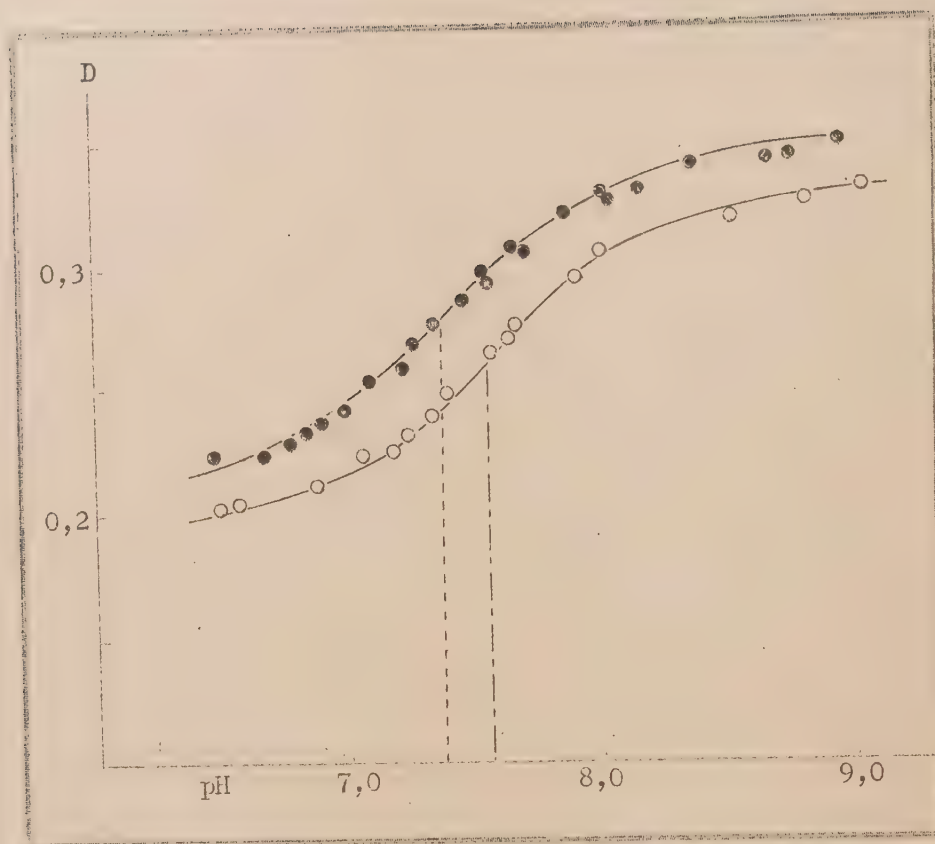


Figure 7. Transformation de la ferriprotoporphyrine acide en ferriprotoporphyrine basique, en absence et en présence d'urée 4 M.

En ordonnées: densité optique à 615 mμ, épaisseur 10 mm.
En abscisses: pH.

Hémine: $7,3 \cdot 10^{-5}$ M; urée: 4 M.

Tampon borate ou phosphate (au-dessous de pH 7,8). $\mu = 0,2$.
Température: 21°C.

○ en tampon.

● en tampon + urée 4 M.

(pK d'ionisation 6,95) ne pourrait pas se complexer, non plus que celle de la pyridine  (pK = 5,4). Dans l'équation d'équilibre que l'on peut écrire pour la réaction (hémime) + q (base) $\rightleftharpoons$ hémime-base_q, il convient donc d'assimiler, à un pH donné, la concentration efficace de la base à la forme de cette base qui a perdu un proton.

Les valeurs globales de log S_B n'ont qu'une signification apparente. La forme susceptible de participer à la formation du complexe est la forme basique de la base. Soit



l'ionisation intéressée.

Désignons par B_x la forme de la base ayant perdu un proton. La concentration efficace de la base en ce qui concerne la complexion est celle de B_x, soit [B_x]. Il s'agit donc d'apporter une correction aux valeurs globales de log S_B pour ne tenir compte que de la concentration de B_x. On peut l'exprimer comme suit:

$$\text{Pour l'équilibre (a), on a } K' = \frac{[\text{B}][\text{H}^+]}{[\text{BH}^+]} \quad (\text{b})$$

$$\text{On en déduit } [\text{B}] = \frac{[\ell]}{1 + \frac{\text{H}^+}{K'}} \quad (\text{c})$$

$$\text{d'où } \log [\text{B}] = \log [\ell] - \log \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K'} \right) \quad (\text{d})$$

où [ℓ] = concentration molaire totale de la base en divers états d'ionisation,

[BH⁺] = concentration molaire de la base à l'état acide conjugué,

[B] = concentration molaire à l'état basique, donc actif pour la complexion = [B_x].

La quantité $\log [B_x]$ à chaque pH peut être calculée à partir de $\log [A]$ en se servant d'un nomogramme qui fait porter $\log (1 + \frac{H^+}{K'})$ contre $pH - pK'$ (figure 8).

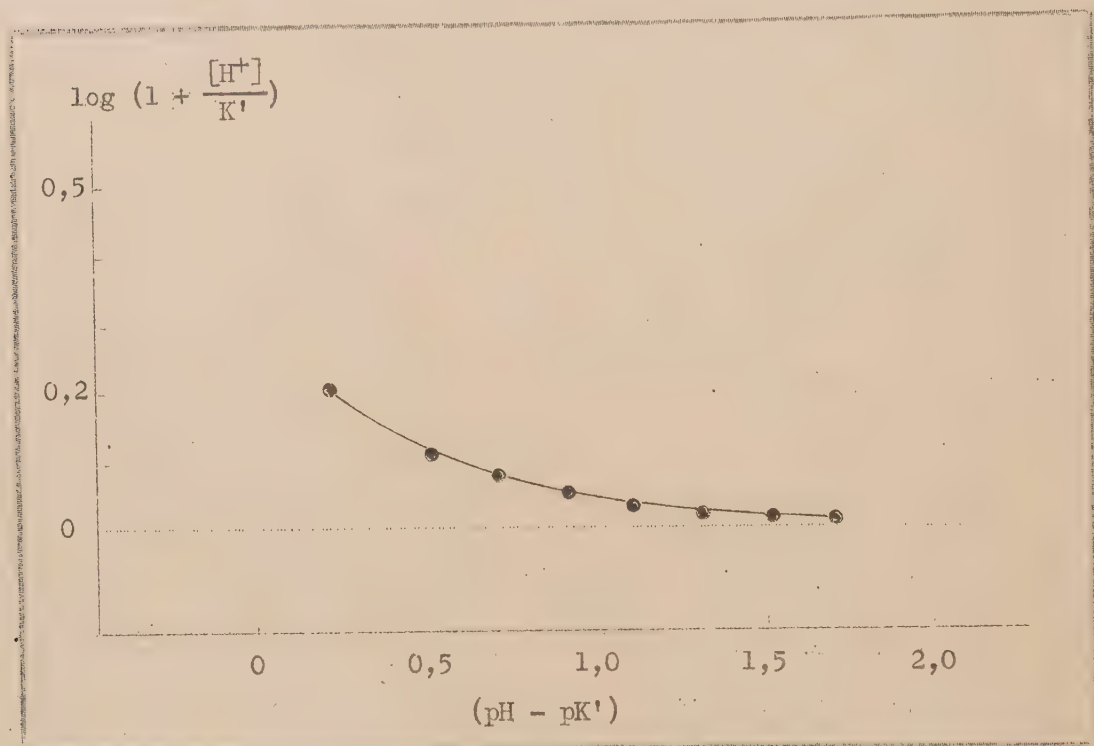


Figure 8.

Le calcul de $\log S_{B_x}$ pour 50 % de saturation, soit $\log S_{B_x 0.5}$, est valable dans la mesure où l'on connaît avec précision le pK' . Or, le pK d'ionisation du pilocarpinate est susceptible d'être modifié en présence d'urée. Pour pouvoir se servir du nomogramme, il s'impose donc de déterminer ce pK en présence d'urée. Nous l'avons fait dans le cas du pilocarpinate, la base que nous avons le plus souvent utilisée.

On titre 50 cm³ d'une solution de pilocarpinate (0,025 M) dissous dans une solution d'urée 4 M par l'acide chlorhydrique (0,25 M), le pH

à chaque étape étant mesuré à l'électrode de verre. Le tableau 3 montre le pK' en fonction de la composition du milieu. Y figurent également les résultats obtenus en solution aqueuse, urée 2 M, alcool éthylique (22 %) et dioxane (17 %).

Tableau 3

Variation du pK' d'ionisation basique du pilocarpinate en fonction de la constante diélectrique du milieu.

Solution	Constante diélectrique	pK' expérimental
Urée 4 M	93	7,80
Urée 2 M	88	7,70
Eau	80	7,52
Alcool éthylique 22 g/100 cm ³	66	7,30
Dioxane 17 cm ³ /100 cm ³	66	7,20

Pilocarpinate 0,025 M, Temp. 23°C.

La connaissance du pK' d'ionisation du pilocarpinate en présence d'urée, comme en solution aqueuse, permet d'apporter les corrections appropriées aux résultats expérimentaux sur $\log S_{B0,5}$, exprimés en concentrations globales, pour faire intervenir les concentrations de la forme efficace, en absence et en présence d'urée. L'importance de cette correction est différente selon qu'il y a ou non de l'urée dans le milieu (conséquence de la modification du pK'). Elle est très faible dans un cas et l'autre en solution de pH supérieur à 9,0, mais devient relativement importante à pH 8,2 (-0,08 sur $\log S_{B0,5}$ en tampon, -0,13 sur $\log S_{B0,5}$ en urée).

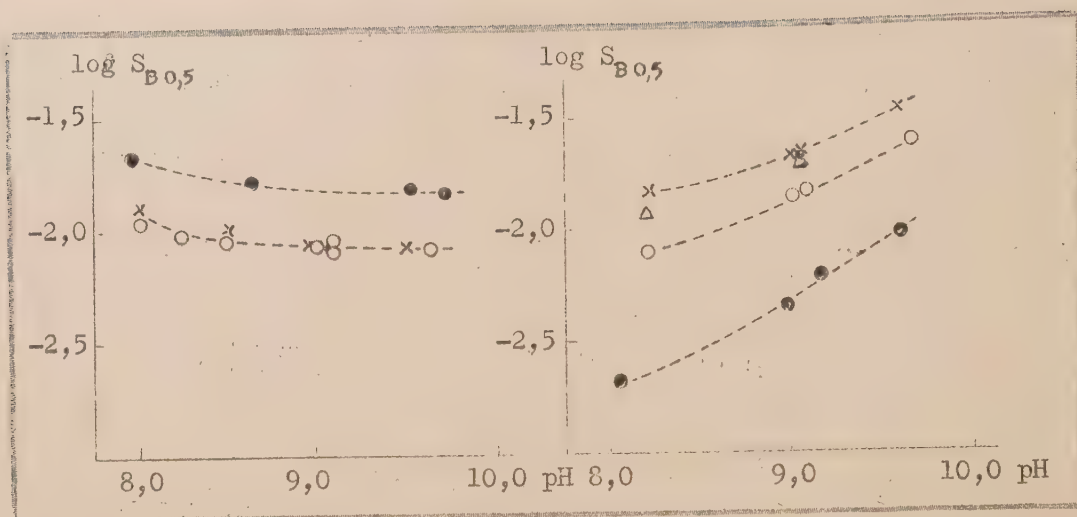


Figure 9. $\log S_{B0,5}$ en fonction du pH.

A gauche: système ferrohème-pilocarpinate.

A droite: système ferrihème-pilocarpinate.

S_B représente la concentration molaire totale en pilocarpinate.

○ en tampon

× en tampon + urée 4 M

△ en tampon + ClNa 0,5 M

● en tampon + alcool 32,5 %

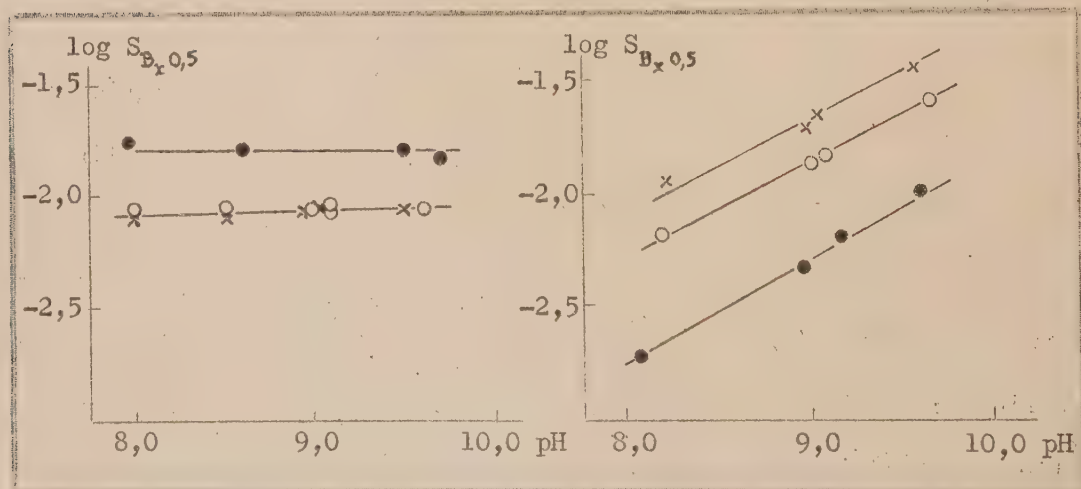


Figure 10. $\log S_{Bx,0,5}$ en fonction du pH pour la complexation de la ferrihème (à droite) et de la ferrohème (à gauche) avec le pilocarpinate. Les valeurs de la concentration globale du pilocarpinate sont ici corrigées afin de ne tenir compte que de la forme basique (B_x).

○ en tampon

× en tampon + urée 4 M

● en tampon + alcool 32,5 %.

Nos résultats expérimentaux vis-à-vis de la concentration de base nécessaire pour saturer à 50 % une quantité donnée de l'hémine oxydée et réduite (5.10^{-5} M) sont représentés dans les figures 9 et 10. La concentration en base dans la figure 9 correspond aux résultats expérimentaux, exprimée en concentration globale. Les corrections apportées à ces valeurs pour divers pH peuvent déplacer les courbes où $\log S_{B0,5}$ est porté en fonction du pH; ce déplacement est plus ou moins important selon le pH (figure 10). Les points correspondant aux $\log S_{B0,5}$ se joignent par des droites, de façon meilleure dans le cas où ces valeurs sont corrigées ($\log S_{Bx0,5}$). Notons que la pente de la droite est égale à 0,5 pour la forme oxydée, tandis qu'elle est nulle pour la forme réduite. On voit une meilleure définition de ces pentes dans la figure 10 où l'on porte les valeurs de concentrations corrigées.

L'examen de la signification de ces pentes permet d'établir un schéma des réactions ferrihémine-base et ferrohémine-base.

8. Schéma des réactions métalloporphyrine-base.

L'analyse des courbes d'association relatives aux formes oxydée et réduite, aux divers pH, a montré que dans l'un et l'autre cas, une unité d'hémine se complexait à 2 molécules de pilocarpinate. Le rôle du pH (fig.10) apparaît différent dans le cas de la forme oxydée et dans celui de la forme réduite.

a) Ferrihémine-base: effet de compétition de l'ion hydroxyle.

Pour la forme oxydée, on constate que les points représentant $\log S_{Bx0,5}$

pour diverses valeurs de pH (en solution basique) tombent sensiblement sur une droite dont la pente est de 0,5. Ceci implique la participation de l'ion hydroxyle dans l'équilibre. Dans le diagramme de $\log S_{B_x 0,5}$ en fonction du pH, l'ordonnée comme l'abscisse expriment les concentrations en unité logarithmique; la pente 0,5 indique donc que l'efficacité de l'ion hydroxyle est moitié de celle de la base.

Les résultats de Shack et Clark [32] sur la conjugaison de la mésoméine avec des bases en solution acide sont indicatifs. On constate (figure 11) que l'affinité globale diminue au-dessous d'un certain pH. La pente de la droite ($\log S_{B_x 0,5}$ en fonction du pH) est alors de -1,0.

On peut expliquer ces résultats en prenant le schéma suivant pour la réaction métalloporphyrine (oxydée)-base:



Seule la forme basique de la métalloporphyrine serait capable de se complexer. En solution basique, il y aurait compétition entre l'ion hydroxyle et les molécules de base pour les positions de coordination, d'où la diminution globale de l'association lorsque la concentration en ions hydroxyles est élevée. L'ion hydroxyle ne peut s'intégrer qu'en une seule position par molécule d'hémine, tandis que la base dispose de deux positions, d'où la pente 0,5. En solution acide, la forme basique de la métalloporphyrine finit par fixer un proton (pK 7,6), pour donner la forme acide conjuguée, incapable de se complexer avec la base (la pente -1,0 s'explique ainsi).

Ces hypothèses peuvent faire l'objet de vérifications expérimentales.

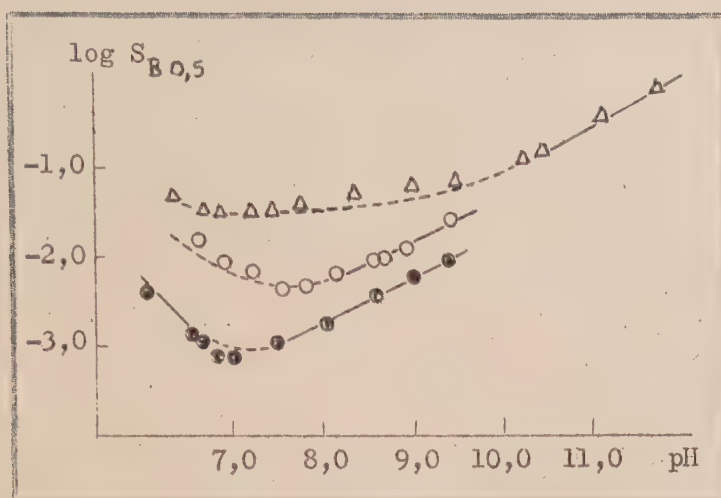


Figure 11. Loi de variation de $\log S_{B0,5}$ en fonction du pH pour la complexation de la mésoméline, d'après les résultats de Shack et Clark.

$S_{B0,5}$ = concentration globale du ligand nécessaire pour saturer à 50 % la mésoméline $7,5 \cdot 10^{-5}M$ ($\beta = 0,5$).

En ordonnées: $\log S_{B0,5}$. En abscisses: pH.

● Imidazole ○ Pilocarpinate △ Histidine

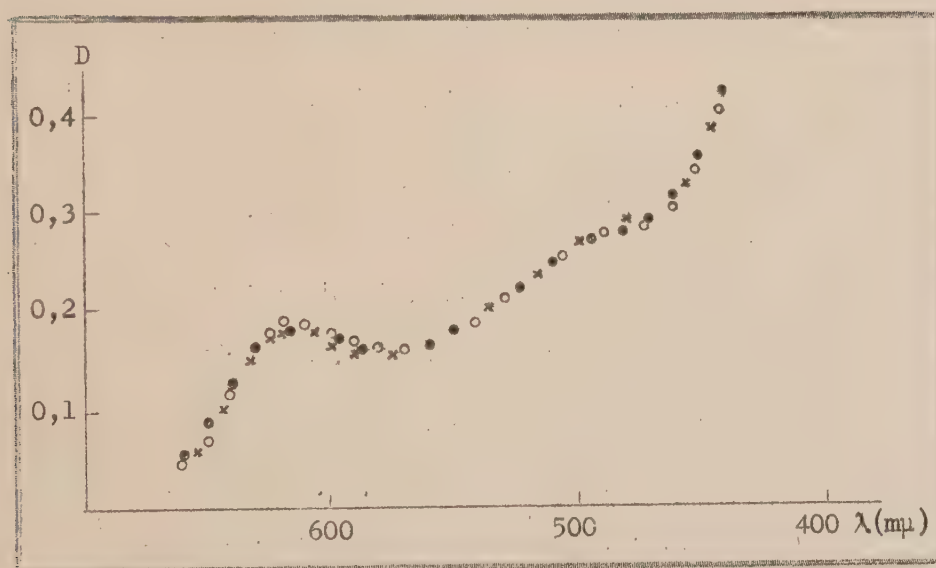


Figure 12. Spectre d'absorption entre 440 et 660 mμ d'une solution d'hémine et d'histidine et d'un mélange d'hémine et de pilocarpinate, en solution alcaline (pH $\sim 12,0$).

En ordonnées: densité optique. En abscisses: longueur d'onde.

○ Hémine $4,5 \cdot 10^{-5}M$; × Hémine $4,5 \cdot 10^{-5}M$ + histidine 0,1 M;
● Hémine $4,5 \cdot 10^{-5}M$ + pilocarpinate 0,08 M

En solution fortement alcaline ($\text{pH} \approx 12$), et en présence d'une concentration en base complexante pas trop forte, l'ion hydroxyle doit pouvoir remplacer, par effet compétitif, toutes les molécules de base des positions de coordination. Le spectre d'absorption d'un tel mélange doit s'identifier au spectre d'absorption de l'hémine basique. De même, du côté acide, en concentration relativement élevée en ion hydrogène, on doit atteindre un état où la quasi-totalité de l'hémine est à l'état acide conjugué, donc non-complexée. Le spectre d'un mélange d'hémine et de base à un pH fortement au-dessous du pK d'ionisation de l'hémine (7,6) doit être analogue à celui de l'hémine seule à l'état acide.

La figure 12 (p.53), fournie à titre d'exemple, montre que cette condition est effectivement réalisée. Les spectres d'absorption d'un mélange d'hémine et d'histidine ou de pilocarpinate à pH 12 se confondent sensiblement avec celui de l'hémine seule au même pH. On peut montrer cette identité également en solution acide; la précision d'une telle vérification est alors moins bonne, car la solubilité décroît brusquement au-dessous de pH 6.

Notons au passage que la formulation de l'effet compétitif ne s'applique pas au cas du complexe hémine-pyridine. On reconnaît dans ce cas un effet additif de l'ion hydroxyle [3]. Le complexe hémine-pyridine en solution basique serait donc décrit par OB_2OH . Cette hypothèse pourtant, rencontre des difficultés d'ordre structural. Parmi les explications avancées figure l'hypothèse d'une heptacoordination.

b) Ferrohémine-base.

En ce qui concerne la complexion de la ferrohémine avec la base, les points exprimant $\log S_{B_x 0,5}$ en fonction du pH tombent sur une droite parallèle à l'axe des abscisses (fig.10,p.50). Toute participation de l'ion hydrogène ou hydroxyle est ainsi exclue. On sait que la ferrohémine ne s'ionise pas (en dehors des groupements carboxyle). La complexion se fait entre la forme unique de la ferrohémine et la forme basique de la base.

Il est donc permis d'écrire, pour cette réaction



c) Constantes d'équilibre.

En tenant compte des schémas de réaction correspondant aux équilibres considérés ci-dessus, on peut, à partir des constantes globales expérimentales mesurées à un pH donné, définir des constantes qui traduisent l'affinité de l'hémine sous sa forme basique susceptible de se complexer, et de la base également sous sa forme basique.

Pour la forme oxydée:



$$K''_O = \frac{[O_{OH}][B_x]^2[H^+]}{[OB_2]} .$$

La demi-saturation globale correspond à une concentration efficace de la base ($S_{B_x 0,5}$) telle que $S_{B_x 0,5} = \frac{S_{B 0,5}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{ab}}}$ et à un rapport O_{OH}/OB_2

inférieur à 1, du fait de l'ionisation de l'hémine (constante d'ionisation K_i):

$$\frac{O_{OH}}{OB_2} = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_i}}$$

On a donc:

$$\log K''_O = 2 \log S_{B_{0.5}} - 2 \log \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{ab}}\right) - \log \left(1 + \frac{[H^+]}{K_i}\right) - pH \quad (12),$$

où K_{ab} = constante de dissociation de la base, $S_{B_{0.5}}$, $S_{B_{x0.5}}$ et K_i ayant leurs significations définies antérieurement.

Pour la forme réduite:



$$K''_R = \frac{[R][B_x]^2}{[RB_2]}$$

$$\begin{aligned} \log K''_R &= 2 \log S_{B_{x0.5}} \\ &= 2 \log S_{B_{0.5}} - 2 \log \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{ab}}\right) \end{aligned} \quad (13).$$

A partir des relations (12) et (13) et en se servant des valeurs expérimentales de $S_{B_{0.5}}$ pour les formes oxydée et réduite, de K_{ab} et de K_i en absence et en présence d'urée, on peut calculer les valeurs de K''_O et K''_R dans un cas et l'autre. Le tableau 4 montre le résultat de ces calculs pour divers pH.

Tableau 4

Les constantes de dissociation des complexes ferrohémimine-pilocarpinate et ferrihémimine-pilocarpinate en absence et en présence d'urée 4 M.

Forme réduite			Forme oxydée		
pH	log K_R''		pH	log K_R''	
	Tampon	Urée 4 M		Tampon	Urée 4 M
8,0	-4,10	-4,16	8,2	-12,65	-12,19
8,5	-4,12	-4,14	9,0	-12,73	-12,35
9,0	-4,10	-4,13	9,05	-	-12,33
9,5	-4,10	-4,10	9,09	-12,77	-
			9,6	-	-12,50
			9,68	-12,85	-

d) Effet de l'urée sur la dissociation des complexes.

Nos résultats expérimentaux montrent que la constante de dissociation ferrihémimine-pilocarpinate est modifiée en présence d'urée, tandis que celle du complexe ferrohémimine-pilocarpinate ne l'est pas. Ceci s'accorde bien avec la connaissance actuelle des liaisons entre la métalloporphyrine oxydée et réduite d'une part et la base de l'autre. Les travaux magnétochimiques de Pauling et Coryell [30] démontrent que les hémochromes sont des corps covalents. Par contre, ces auteurs retrouvent, dans la ferrihémimine dissoute dans la pyridine, la susceptibilité magnétique liée à l'ion ferrique, ce qui conduit à la conclusion que le complexe hémimine-pyridine (hémichrome) est électrovalent. Nous avons pu vérifier, par mesures magnétiques, le caractère électrovalent du complexe hémimine-pilocarpinate. Un accroissement de la constante diélectrique du milieu doit entraîner un affaiblissement de la liaison électrovalente

donc une augmentation de la constante de dissociation. Il en est de même en présence de sel (augmentation de la force ionique). D'autre part, le caractère covalent du complexe ferrohémine-pilocarpinate rend la dissociation insensible à une variation de la constante diélectrique du milieu.

Dans le cas du complexe hémine-cyanuré, les liaisons sont covalentes, dans la forme oxydée comme dans la forme réduite [14,30]; une augmentation de la constante diélectrique du milieu ne modifie donc ni l'une ni l'autre des constantes de dissociation, ce qui suffit à expliquer que l'urée n'apporte aucune variation au potentiel de ce système. Ce fait indique qu'il semble permis d'exclure l'intervention d'une variation des coefficients d'activité des corps dissous pour rendre compte de l'effet de l'urée sur le potentiel des autres systèmes considérés.

c) Effet d'une variation de la température sur ΔE ($\partial \Delta E / \partial T$):
analyse des résultats antérieurs.

Nos expériences sur plusieurs séries de complexes (hémine-pilocarpinate, hémine-pyridine, hémine- α -picoline) ont montré que la modification apportée par l'urée 4 M au potentiel de demi-réduction n'est pas touchée par une variation de la température entre 30°C et 10°C ($\partial \Delta E / \partial T = 0$). Nous avons cherché à analyser ce fait en mesurant directement le coefficient de température des constantes de dissociation des complexes ferri-hémine-pilocarpinate et ferrohémine-pilocarpinate en solution tampon et en solution tampon-urée. On se souvient que la modification du potentiel (ΔE) est donnée par une relation faisant intervenir le rapport de ces constantes.

Les expériences consistent à construire les courbes d'association en divers milieux à la température de 40°C. On utilise le spectrophotomètre Beckman modèle DU dont le compartiment à cuve est maintenu à cette température. La densité optique de la ferrihémine et de la ferrohémine (5.10^{-5} M) en absence et en présence de taux croissants de pilocarpinate est ainsi mesurée à 40°C. On obtient finalement une série des valeurs de $\log S_{B0,5}$ à 40°C pour les formes oxydée et réduite, en absence et en présence d'urée 4 M.

En substituant ces valeurs de $\log S_{B0,5}$ à 40°C dans les équations (m) (n)(page 36) et (10)(page 18) on obtient pour $(\Delta E)_{40^\circ C}$ une valeur sensiblement analogue à celle obtenue à 20°C, ce qui est en accord avec les résultats apportés par les mesures de potentiel (un effet nul de la température sur ΔE).

Cette dernière étude apporte de plus des renseignements complémentaires. Une détermination expérimentale du pK_{ab} du pilocarpinate en absence et en présence d'urée à 40°C permet de corriger les valeurs de $\log S_{B0,5}$ afin de ne tenir compte que de la forme basique du pilocarpinate. Nous trouvons 7,32 et 7,50 pour pK_{ab} du pilocarpinate à 40°C en solution aqueuse et en urée 4 M respectivement. La figure 13 (p.60) rassemble les données de $\log S_{Bx0,5}$, à 20°C et à 40°C, tant pour la forme oxydée que pour la forme réduite.

On voit que $\log S_{Bx0,5}$ (et par conséquent K''_O et K''_R) se modifie avec la température. Le pilocarpinate manifeste moins d'affinité pour l'hémine à 40°C qu'à 20°C, aussi bien en solution tampon qu'en solution tampon-urée. Ceci se produit également en ce qui concerne la complexion de la ferro-

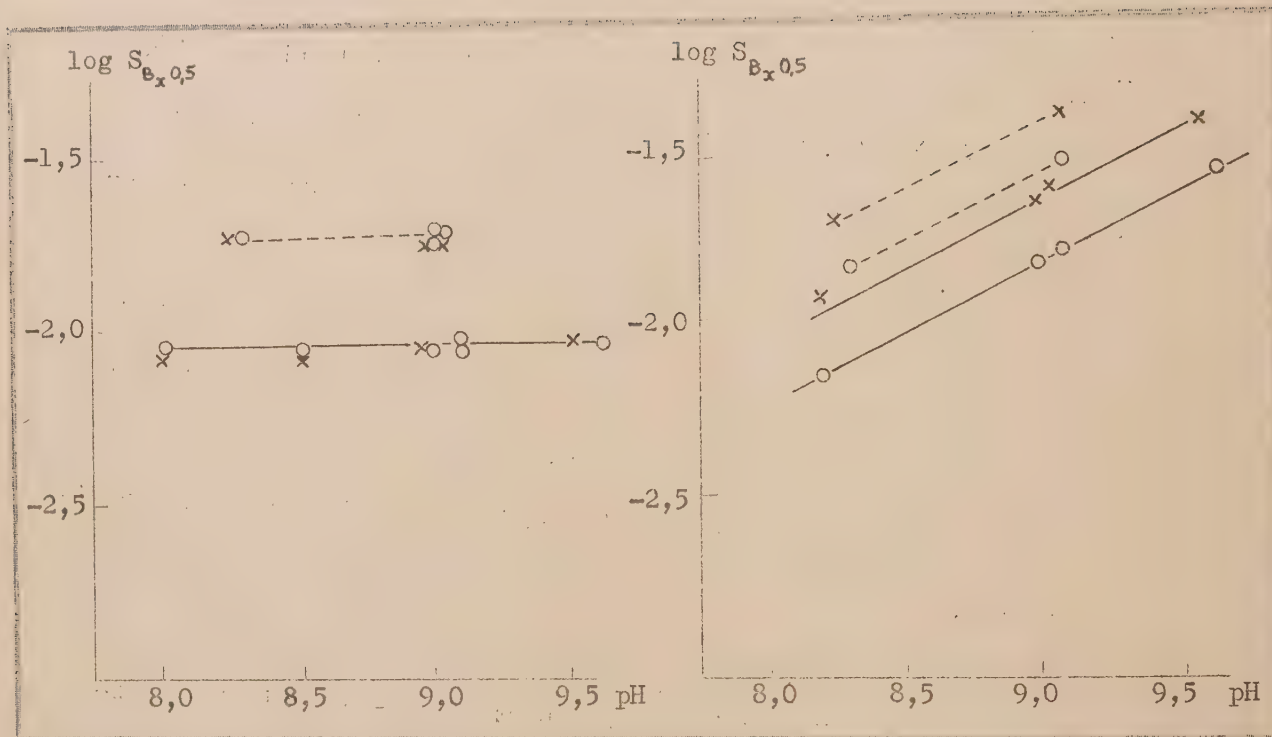


Figure 13. Ensemble des résultats donnant $\log S_{Bx0.5}$ en fonction du pH, pour les systèmes ferrihème-pilocarpinate et ferrihème-pilocarpinate, en absence et en présence d'urée 4 M, à 20°C et à 40°C.

A gauche: ferrihème-pilocarpinate. Hème: $5 \cdot 10^{-5}$ M.

A droite: ferrihème-pilocarpinate. Hème: $5 \cdot 10^{-5}$ M.

o valeurs en solution tampon.

x valeurs en solution tampon-urée.

Les points correspondant aux droites en trait plein représentent les valeurs à 20°C; ceux correspondant aux droites en trait pointillé, tracées pour la clarté du graphique, représentent les valeurs à 40°C.

hémine avec le pilocarpinate. Les variations de $\log S_{B_{x0.5}}$ avec la température, soit $\sigma (\log S_{B_{x0.5}}) / \sigma T$ sont très voisines pour la complexion du pilocarpinate avec la ferrihémine et la ferrohémine, et ne sont pas, à la précision des mesures, modifiées par la présence d'urée dans le milieu.

9. Effet sur ΔE et sur les constantes de dissociation globales d'autres agents susceptibles de modifier la constante diélectrique.

L'analyse des divers équilibres en jeu nous a conduit à l'hypothèse que l'effet global de l'urée sur le potentiel d'oxydoréduction du système hémine-pilocarpinate s'explique par la variation de la constante d'équilibre hémine-pilocarpinate due à l'augmentation de la constante diélectrique du milieu.

Un moyen de recouper ces conclusions consiste à travailler en d'autres milieux, en modifiant la constante diélectrique par d'autres agents. Pour abaisser la constante diélectrique on dispose de nombreux corps dont l'alcool, le dioxane, l'acétone, etc.; pour la relever on peut utiliser les acides aminés.

Nous avons utilisé l'alcool à 32,5 % ($\epsilon = 60$), le dioxane à 20 % ($\epsilon = 60$) et le glycolle 0,56 molaire ($\epsilon = 93$). Nous avons comme précédemment opéré les titrages d'oxydoréduction, qui nous ont fourni les variations (ΔE) de potentiel introduites par ces milieux. D'autre part, nous avons déterminé les constantes de dissociation K'_O et K'_R en milieu modifié suivant les mêmes techniques que celles employées auparavant. La formule stoechiométrique du complexe est analogue à celle que l'on observe en tampon seul pour la forme oxydée (OB_2) et pour la forme réduite (RB_2).

La comparaison des valeurs expérimentales de ΔE et des valeurs calculées à partir des constantes de dissociation donne les résultats suivants:

En solution alcoolique (32,5 %):

$$\begin{array}{lll} \text{A pH } 8,2, & \Delta E_{\text{cal}} = -82 \text{ mV}; & \Delta E_{\text{obs}} = -45 \text{ mV} \\ \text{pH } 9,0, & \Delta E_{\text{cal}} = -79 \text{ mV}; & \Delta E_{\text{obs}} = -50 \text{ mV}. \end{array}$$

L'accord quantitatif entre les résultats expérimentaux directs et ceux calculés est moins bon que celui que l'on observe en présence d'urée 4 M.

Nous n'avons pas d'explication quantitative pour ce mauvais accord. Pourtant on peut signaler quelques faits significatifs.

On voit d'après la figure 9 (p.50), que les valeurs de $\log S_{805}$ relatives à l'association de la ferrohémine et du pilocarpinate sont plus élevées en solution alcoolique que celles en tampon ou tampon urée. En d'autres termes, l'association ferrohémine-pilocarpinate se trouve défavorisée en milieu alcoolique. Ceci n'est pas compréhensible à priori, étant donné la nature covalente des liaisons qui joignent la ferrohémine à la base. Une variation de la constante diélectrique du milieu ne devrait pas avoir un effet important sur la constante d'équilibre dans ce cas.

Un fait expérimental paraît intéressant à cet égard. On remarque, pour une solution d'hémine contenant de l'alcool, une absorption optique plus élevée que celle d'une solution ayant la même concentration apparente d'hémine en tampon. La raison évidente en est une meilleure dispersion des agrégats d'hémine en présence d'alcool. Cowgill et Clark (loc. cit.) ont considéré cette possibilité en travaillant avec la mésohémine

en solution alcoolique à 23 %. Dans notre esprit il ne s'agit pas d'un relâchement de très faibles forces d'agrégation qui tiennent ensemble les monomères (ces agrégats se défont par addition d'un ligand); mais par contre, il peut s'agir des agrégats plus stables qui renferment les monomères d'hémine dans une situation où ils ne peuvent pas subir l'oxydoréduction (cf.p.27). La concentration effective des unités de l'hémine active sera donc, d'après cette hypothèse, plus grande en solution contenant l'alcool qu'en solution aqueuse. Il est normal qu'une concentration plus grande en pilocarpinate ($\log S_{B0.5}$ plus élevé) soit nécessaire pour arriver à saturer l'hémine à 50 %. Un calcul approximatif (à partir des données d'absorption) montre en effet que pour une concentration comparable de l'hémine active, les valeurs de $\log S_{B0.5}$ en solution alcoolique se rapprochent de celles en solution tampon ou tampon-urée.

Nos données sur $\log S_{B0.5}$ pour l'hémine-pilocarpinate en solution alcoolique sont donc entachées d'une certaine incertitude. Suivant l'hypothèse développée ci-dessus, si l'on identifie $(\log K'_R)_{\text{alcool}}$ avec $(\log K'_R)_{\text{tampon}}$ dans la formule (10)(p.18), on trouve une valeur calculée de ΔE qui s'accorde mieux avec la valeur ΔE expérimentale.

$$\begin{aligned} (\text{A pH } 8,2, \quad \Delta E_{\text{cal}} &= -45 \text{ mV}; \quad \Delta E_{\text{exp}} = -42 \text{ mV}; \\ \text{pH } 9,2, \quad \Delta E_{\text{cal}} &= -51 \text{ mV}; \quad \Delta E_{\text{exp}} = -49 \text{ mV}). \end{aligned}$$

A faible concentration (< 20 %) en dioxane, on retrouve les mêmes effets qu'en présence d'alcool. L'affinité de la ferrihémine pour le pilocarpinate augmente en présence de dioxane. L'exploitation quantitative des résultats devient difficile puisqu'on se trouve dans une situation analogue à celle que l'on observe en présence d'alcool pour la complexion

de la forme réduite avec la base. $\log S_{pQ5}$ est moins négatif qu'en tampon, mais parallèlement, on est en présence d'une meilleure dispersion de la ferrohémine.

L'augmentation de la constante diélectrique peut être obtenue théoriquement par addition d'acides aminés à la solution. On se heurte pourtant à des difficultés d'ordre pratique. Celles-ci sont illustrées en prenant le cas du glycocolle.

La constante diélectrique d'une solution est donnée par la relation

$$\epsilon = \epsilon_0 + \alpha c + \dots ,$$

où ϵ = la constante diélectrique de la solution,

ϵ_0 = la constante diélectrique du solvant,

$\alpha = \frac{d\epsilon}{dc}$, une constante spécifique pour le soluté dans des conditions définies,

$\alpha = +22,7$ pour le glycocolle à 18°C et jusqu'à la concentration de 2,5 molaire.

c = concentration du soluté en mole/litre.

Pour atteindre une valeur de 93 pour ϵ (égale à celle que donne l'urée 4 M), on doit avoir une concentration 0,53 molaire environ en glycocolle.

Ceci n'est valable qu'autour du point isoélectrique. La constante diélectrique d'une solution donnée de l'acide aminé diminue en fonction du pH au fur et à mesure que l'on s'écarte du point isoélectrique. La figure 14 tirée de l'ouvrage de Dunning et Shutt [18] illustre bien ce phénomène. Il est évident qu'une solution 0,53 M de glycocolle ne peut avoir ϵ égale à 93 qu'entre pH 5 et 7. Quand le pH est supérieur à 7, on

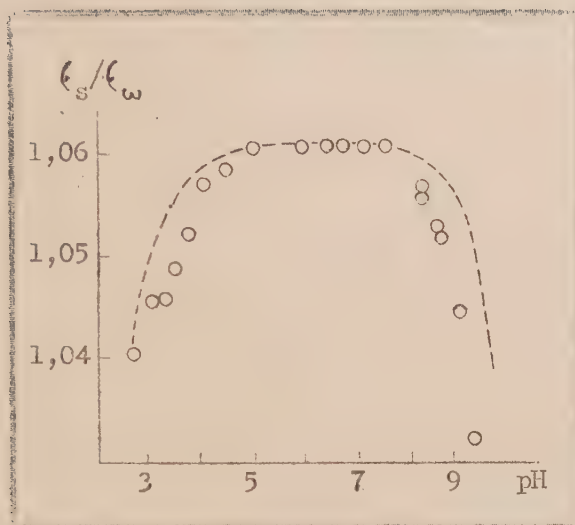


Figure 14. Constante diélectrique d'une solution de glycolle (0,2 M) en fonction du pH (d'après Dunning et Shutt).

En ordonnées: $\epsilon_s/\epsilon_w = \epsilon_{\text{solution}} / \epsilon_{\text{eau}}$.

En abscisses: pH.

○ Points correspondant aux résultats expérimentaux.
 Courbe en trait pointillé: valeurs calculées.

devra avoir plus de glycolle dans la solution pour atteindre cette valeur de ϵ . Dans notre cas cette opération devient risquée puisque l'augmentation du taux de glycolle à un pH supérieur à 7 fait augmenter

également la concentration des groupes -NH_2 ($\text{pK} = 9,75$). Or, il se trouve que ce groupe se coordonne avec l'hémine (ce que nous avons vérifié spectralement). Les conditions les plus appropriées seraient de travailler à pH inférieur à 7 (constante diélectrique maximum, pH très éloigné du pK_{ab} donc activité minime du groupe -NH_2). Mais on se souvient que dans cette région, l'équilibre du pilocarpinate avec l'hémine se trouve compliqué par divers états d'ionisation, et devient moins susceptible d'être défini par des équations simples. A cette équivoque s'ajoute encore la difficulté de faire des titrages d'oxydoréduction à cause de la diminution de la solubilité de l'hémine dans cette région. Il est donc illusoire d'essayer d'obtenir par addition de glycolle une valeur de la constante diélectrique égale à celle que donne l'urée 4 M et d'en tirer des conclusions rigoureuses. Néanmoins, de nombreuses expériences que nous avons entreprises dans ce sens ont donné des résultats qualitativement concordants. On trouve en général, par addition de glycolle,

- a) une augmentation du potentiel d'oxydoréduction,
- b) une valeur plus élevée de $\log S_{eq5}$ pour la complexion ferrihémine-pilocarpinate, ce qui indique un relâchement des liaisons,
- c) pour la ferrohémine-pilocarpinate, une valeur de $\log S_{80,5}$ proche de celle en solution tampon.

L'ensemble des résultats expérimentaux relatifs à la modification du potentiel d'oxydoréduction du système hémine-pilocarpinate par divers

agents (urée, alcool, glycolle) est montré dans la figure 15.

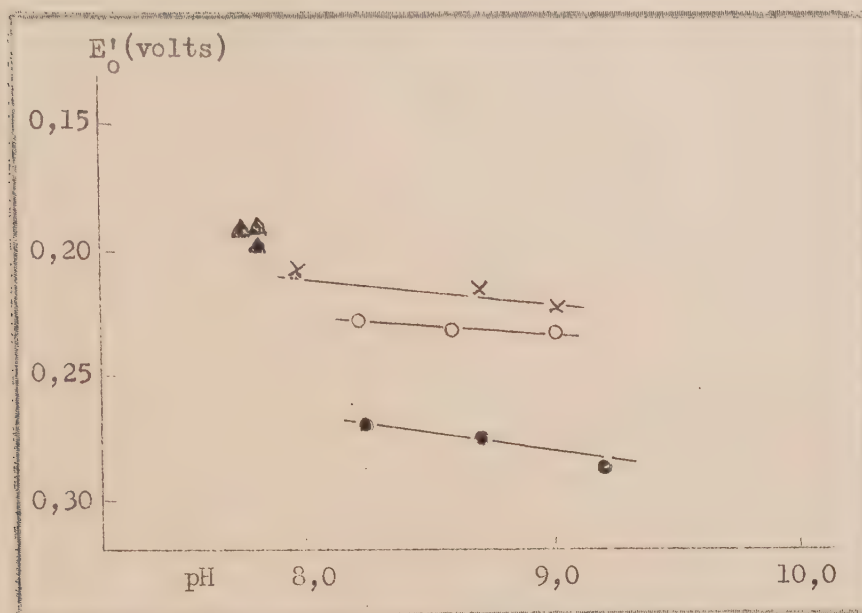


Figure 15. Potentiel d'oxydoréduction du complexe hémine-pilocarpinate en milieux de constantes diélectriques différentes.

En ordonnées: E'_0 en volts. En abscisses: pH.

- en tampon ($\epsilon = 80$) × en tampon + urée 4 M ($\epsilon=93$)
 ● en tampon + alcool 32,5% ($\epsilon=60$) ▲ en tampon + glycolle 0,53M ($\epsilon=93$)

Nous pouvons conclure que la variation de la constante diélectrique du milieu (entraînant par conséquent un relâchement des liaisons ferri-hémine-base) suffit à rendre compte de l'effet de l'urée sur le potentiel d'oxydoréduction.

On explique ainsi de façon assez satisfaisante l'action de l'urée sur le potentiel d'oxydoréduction du système hémine-pilocarpinate. Nous avons appliqué les mêmes techniques et raisonnements à l'étude du système hémine- α -picoline; les résultats sur la modification des constantes de dissociation rendent compte de façon relativement qualitative de l'action

de l'urée sur le potentiel de ce système. L'exploitation quantitative des mesures n'a été faite que dans une zone de pH restreinte, le composé ferrohémine- α -picoline subissant une dimérisation dans d'autres régions de pH. Toutefois, le calcul à partir de la modification des constantes d'équilibre conduit à un abaissement du potentiel par action de l'urée, fait que l'on retrouve expérimentalement.

10. Discussion d'ensemble des résultats.

Il ressort de l'ensemble de cette étude que l'effet de l'urée sur les "modèles" que nous avons choisis, les complexes hémine-bases azotées, s'explique de façon satisfaisante par l'accroissement de la constante diélectrique du milieu. En ce qui concerne les hémoprotéines, sans doute l'effet diélectrique y joue-t-il un rôle, mais la méthémoglobine et l'hémoglobine sont toutes les deux des complexes ioniques, alors que seule la forme oxydée des complexes hémine-base azotée présente ce caractère. L'effet diélectrique dû à la présence d'urée doit donc être de modifier l'un et l'autre des équilibres relatifs à l'hémoglobine et à la méthémoglobine, et dans le même sens: vers un relâchement de l'affinité globine-métalloporphyrine. Il est possible que ces effets se contrebalancent, puisque nous ne trouvons pas de modification notable du potentiel hémoglobine-méthémoglobine en présence de sel ou de glycocolle.

D'autre part un fait expérimental distingue l'effet de l'urée sur l'hémoprotéine et sur les complexes hémine-base azotée qui nous ont servi de modèles: alors que la différence des variations d'entropie liées à l'action de l'urée sur l'hémoglobine et la méthémoglobine est de 16 unités

environ, elle est nulle pour les formes réduite et oxydée des complexes hémine-base azotée. Il y a là une indication que l'action de l'urée sur le potentiel d'oxydoréduction du système hémoglobine-méthémoglobine peut englober divers effets qui ne seraient pas strictement localisés à la liaison hème-protéine, mais qui intéresseraient la partie protéique des molécules. Colson-Guastalla préconise la rupture de quelques liaisons hydrogène par suite de l'effet immédiat de l'urée. La fixation des molécules d'urée peut également jouer un rôle, étant donné la modification du potentiel par l'urée 2 M.

Cette étude prétend n'avoir isolé qu'un aspect du phénomène global qui, selon toute vraisemblance, est complexe.

* * *

C. Résumé, première partie.

1. La présence d'urée 4 M apporte un abaissement de 35 à 40 mV au potentiel d'oxydoréduction du système hémoglobine-méthémoglobine de cheval. Ce résultat, antérieurement établi par Taylor, a été retrouvé. Les titrages en présence d'urée 2 M font ressortir un effet semblable, quoique de moindre importance.

2. Cette action de l'urée est immédiate et indépendante de la transformation spectrale de la méthémoglobine de cheval par l'urée. En outre, une variation de température agit sur cette modification de potentiel ΔE apportée par l'urée au système hémoglobine-méthémoglobine de

cheval, fait conforme aux résultats antérieurs pour l'action de l'urée sur le système hémoglobine-méthémoglobine humaines. Ce fait indique que l'action de l'urée sur l'hémoglobine et sur la méthémoglobine respectivement correspond à des variations d'entropie différentes.

3. Les complexes de la ferrihème et de la ferrohème avec des bases azotées peuvent être rapprochés de la méthémoglobine et de l'hémoglobine. On a entrepris une étude de l'action de l'urée sur ces complexes afin de voir dans quelle mesure l'action de l'urée sur les hémoprotéines pouvait être localisée aux groupes prosthétiques et à leur voisinage immédiat.

4. Le potentiel d'oxydoréduction de plusieurs complexes hème-base azotée est modifié par la présence d'urée 4 M dans le milieu. Le complexe hème-cyanure n'est pas affecté.

La modification ΔE apportée par l'urée au potentiel d'oxydoréduction de ces complexes n'est pas affectée par une variation de température δT ; $[\delta \Delta E / \delta T] = 0$.

5. La détermination spectrophotométrique des constantes de dissociation des complexes ferrohème- et ferrihème-pilocarpinate, en l'absence et en présence d'urée, nous a permis de rendre compte, en l'analysant, de la modification apportée par l'urée au potentiel d'oxydoréduction de ces systèmes.

L'étude a été faite à plusieurs températures.

6. On considère successivement les divers équilibres en jeu, afin d'isoler ceux qui sont susceptibles d'être modifiés par l'urée. La con-

stante d'équilibre de la réaction ferrihémine-base est modifiée en présence d'urée, celle de la réaction ferrohémine-base ne l'est pas. Etant donnée la nature des liaisons en présence (ionique dans le premier cas et covalente dans l'autre), l'effet de l'urée sur les constantes d'équilibre, et par conséquent sur le potentiel d'oxydoréduction, paraît lié à l'augmentation de la constante diélectrique due à sa présence.

7. L'étude du potentiel d'oxydoréduction et des constantes d'équilibre en divers milieux de constante diélectrique différente (mélange eau alcool, eau dioxane, solution aqueuse de glycocolle) montre que l'effet diélectrique de l'urée suffit à rendre des compte des modifications qu'elle apporte au potentiel d'oxydoréduction.

8. On discute les éléments qui rapprochent et qui distinguent l'action de l'urée sur les hémoprotéines de l'action de l'urée sur les complexes hémine-base azotée.

* *

*

DEUXIEME PARTIE

ACTION DE LA GUANIDINE

Dans la première partie de cette étude, on a tenté d'analyser le mécanisme d'action de l'urée sur le potentiel du système oxydoréducteur hémoglobine-méthémoglobine: il s'agissait de l'action primaire immédiate de l'urée, précédant toute modification spectrale qu'il est ensuite possible d'observer. On s'était toujours placé dans des conditions telles (pH, concentration en urée, température) que la modification spectrale correspondait à une transformation simple: passage d'une forme spectrale initiale à une forme spectrale finale unique.

Il est intéressant de rechercher si d'autres agents dénaturants sont susceptibles de présenter un mode d'action comparable: s'il est possible de déterminer des conditions telles que les modifications apportées à l'hémoprotéine correspondent à une transformation simple. Observe-t-on, comme dans le cas de l'urée, une action primaire immédiate se traduisant par une variation du potentiel du système hémoglobine-méthémoglobine, et s'il en est ainsi, quels sont les caractères de cette action?

L'action dénaturante de la guanidine sur les protéines a fait l'objet de nombreuses études; on a le plus souvent utilisé les critères de solubilité et de viscosité de la protéine pour suivre cette action. On sait que la guanidine est un agent dénaturant plus puissant que l'urée.

Pour l'étude de la dénaturation on a utilisé une concentration de guanidine allant jusqu'à 2,5 molaire. Dans l'étude qui suit, nous allons nous placer dans des conditions particulièrement restreintes, la concentration de guanidine ne dépassant pas 0,9 molaire.

A. Effet de la guanidine (0,9 molaire) sur le potentiel d'oxydoréduction du système hémoglobine-méthémoglobine.

La guanidine, contrairement à l'urée, n'a pas d'action solubilisante sur les protéines. L'évolution de la méthémoglobine en présence de la guanidine se manifeste, entre autres, par une précipitation. La vitesse d'apparition d'un trouble est fonction de plusieurs facteurs, en particulier la concentration de la protéine, le taux de la guanidine, la température et le pH. Pourtant, lorsque la concentration de la protéine est faible, ($5 \cdot 10^{-5}$ M), il est effectivement possible de se placer dans des conditions où l'on observe l'évolution spectrale de la forme native vers une forme spectrale finale unique qui, selon le raisonnement de Colson-Guastalla [6] représenterait la fin d'une transformation simple. La concentration en guanidine ne doit pas dépasser 0,9 molaire. Nous n'avons pas recueilli assez de données pour définir la cinétique de cette transformation, mais les résultats de quelques expériences à divers pH nous conduisent à admettre que la loi de variation de la constante de vitesse en fonction du pH est proche de celle décrite par Colson-Guastalla pour la transformation de la méthémoglobine en présence d'urée. La vitesse est

minimum vers pH 6,8 et augmente du côté acide comme du côté basique de ce point. Pour une solution de méthémoglobine 2.10^{-4} M (atome de fer) en présence de chlorhydrate de guanidine à la concentration 0,9 M, la transformation est assez lente à 30°C et à pH 6,8 pour permettre l'achèvement d'un titrage par réduction, sans que l'on constate aucun trouble à la fin du titrage. Par contre, à partir de pH 6,5 du côté acide et 7,2 du côté basique on ne peut plus opérer par titrage. Afin d'étudier l'effet de la guanidine sur le potentiel d'oxydoréduction du système hémoglobine-méthémoglobine il a donc fallu opérer par une méthode quasi-instantanée. La figure 16 (p.76) montre le dispositif employé à cette fin.

On titre 50 cm³ d'une solution tamponnée de méthémoglobine (2.10^{-4} M) par le sulfonate de β -anthraquinone réduite, jusqu'à ce que l'on se trouve au point de demi-réduction. En ce point on injecte dans la solution la quantité voulue d'une solution de chlorhydrate de guanidine pareillement tamponnée et portée au même niveau de potentiel (par dégazage suivi de l'addition d'une petite quantité de la solution réductrice en présence d'un indicateur d'oxydoréduction, le bleu de toluyène). La quantité de solution ajoutée est telle que la concentration finale de la guanidine dans la solution protéique atteigne 0,9 M. On maintient l'agitation magnétique, comme pendant tout le long du titrage. Le potentiel enregistre un départ brusque, mais se stabilise en peu de temps (5 à 12 minutes) à une valeur qui demeure constante jusqu'à l'apparition du trouble par suite de l'évolution de l'hémoprotéine en présence de guanidine. Dans des conditions favorables, on peut même achever le titrage par réduction avant l'apparition du trouble. Plusieurs expériences de contrôle,

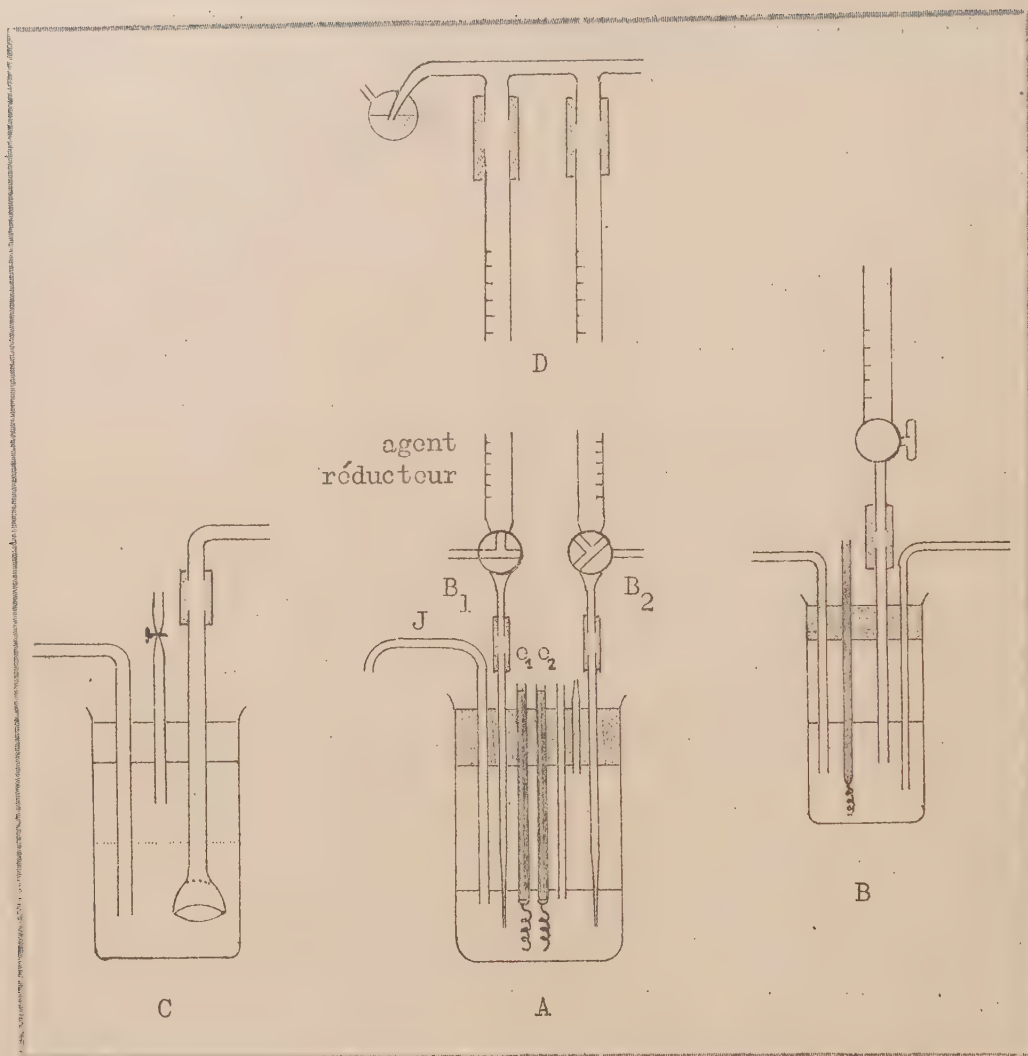


Figure 16. Dispositif de titrage par réduction permettant d'introduire la guanidine en cours de titrage.

- A : Vase à titrage proprement dit (e_1 , e_2 , électrodes; J, jonction liquide; B_1 , burette agent réducteur; B_2 , burette guanidine).
- B : Vase à titrage dans lequel on amène la solution de guanidine au potentiel désiré avant de l'introduire en B_2 .
- C : Vase de préparation de l'agent réducteur.
- D : Partie supérieure des burettes B_1 , B_2 (maintenues sous argon).

en ajoutant du tampon au lieu d'une solution de guanidine au mélange protéique ont permis de vérifier la précision de la technique: on n'observe pas alors de variation de potentiel supérieure à 1 à 3 mV. Une erreur de cet ordre est petite devant l'effet observé en présence de guanidine. La figure 17 représente ces résultats pour une zone de pH comprise entre 5,8 et 7,5.

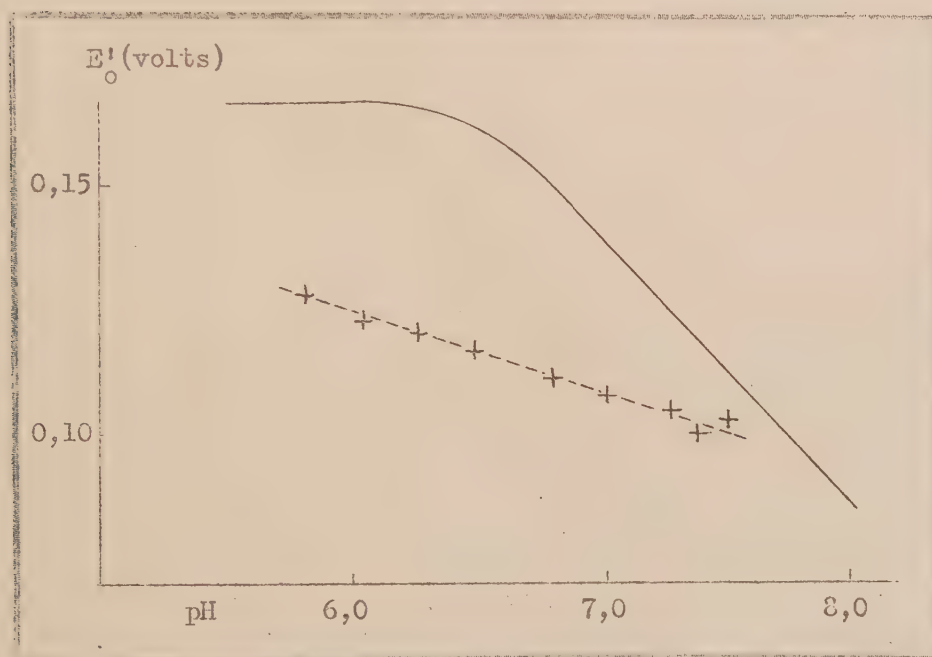


Figure 17. Effet de la guanidine (0,9 M) sur le potentiel de demi-réduction de la méthémoglobine de cheval entre pH 5,8 et 7,5 .

Méthémoglobine : $2 \cdot 10^{-4}$ M; température : 30°C.

+ Potentiel de demi-réduction en présence de guanidine.HCl (0,9 M).

La courbe en trait plein est dessinée d'après les résultats de Taylor et Hastings, en tampon.

L'action de la guanidine consiste en un abaissement du potentiel de demi-réduction (E'_0) de 40 mV environ à pH 5,9 et de 15 mV environ à pH 7,5. Les points représentent les valeurs de potentiel en présence de

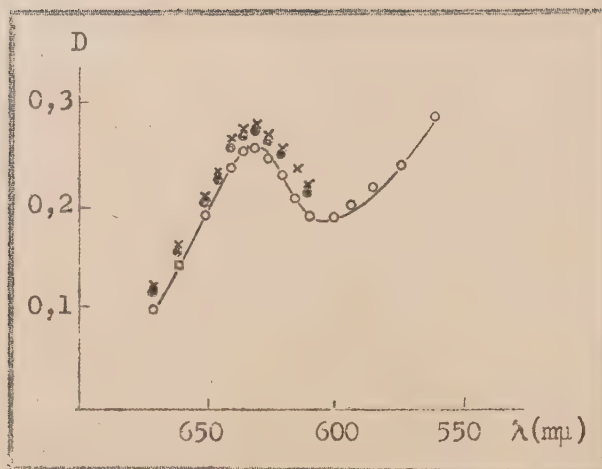


Figure 18.

Spectre d'absorption de la méthémoglobine de cheval ($C = 5 \cdot 10^{-5} M$, sur 1 cm) entre 600 et 670 mμ après incubations de durées différentes, en présence de guanidine.HCl, à pH 6,5.

- guanidine 0,6 M, environ 10 minutes d'incubation,
- ◉ guanidine 0,6 M, environ 90 minutes d'incubation,
- × guanidine 1,0 M, environ 15 minutes d'incubation.

Courbe en trait plein: méthémoglobine en tampon seul.

guanidine se trouvent sensiblement sur une droite dans la région de pH étudiée; la pente de cette droite est de 17 mV environ par unité de pH.

La loi de variation du potentiel en fonction du pH subit donc un changement radical en présence de guanidine. Dans le système hémoglobine-méthémoglobine native, la courbe de E'_0 en fonction du pH présente deux tronçons linéaires, l'un est parallèle à l'axe des pH, l'autre a une pente correspondant à une variation du potentiel de 60 mV par unité de pH; le point d'intersection correspondrait à une ionisation (pK à 6,5) dans la molécule de méthémoglobine. L'action globale de la guanidine sur le système hémoglobine-méthémoglobine paraît donc entraîner la disparition de cette ionisation.

1. Nature instantanée de l'action de la guanidine.

Les expériences sur l'effet de la guanidine sur le potentiel correspondent à des conditions telles que le spectre de la méthémoglobine évolue peu pendant la période de stabilisation du potentiel après injection de la guanidine. La figure 18 donne, à titre d'exemple, la bande dans le rouge du spectre de la méthémoglobine, seule et en présence de taux divers de guanidine dans les conditions indiquées de pH et de température. Une légère hausse dans l'absorption après incubation en présence de guanidine 1,0 M pour 15 minutes et 0,6 M pour 90 minutes est vraisemblablement due à l'apparition d'un trouble invisible à l'œil nu. On s'est assuré ainsi que dans les conditions de l'expérience (0,9 M guanidine à 30°C et à pH compris entre 5,8 et 7,5) le spectre de la méthémoglobine n'est guère affecté dans une période de 12 minutes (temps maximum nécessaire à la stabi-

lisation du potentiel dans nos expériences).

Ces considérations nous font penser que l'effet de la guanidine sur le potentiel d'oxydoréduction correspond, comme celui de l'urée, à une action immédiate sur l'hémoprotéine, en dehors de toute transformation dénaturante proprement dite.

2. Données thermodynamiques relatives à l'action primaire de la guanidine.

Il est raisonnable de considérer l'abaissement de potentiel comme lié à une action primaire de la guanidine sur l'une au moins des deux formes présentes, i.e l'hémoglobine et la méthémoglobine. On peut considérer qu'il s'agit de réactions d'équilibre * dont on peut définir la variation d'énergie libre ΔF , la variation d'enthalpie ΔH et la variation d'entropie ΔS . Désignons par $\Delta F_1, \Delta H_1, \Delta S_1$ les valeurs de ces grandeurs en ce qui concerne la réaction avec l'hémoglobine, et par $\Delta F_2, \Delta H_2, \Delta S_2$ les valeurs pour la réaction avec la méthémoglobine. Ces valeurs se rapportent, dans les deux cas, à la quantité de l'hémoprotéine renfermant 1 atome-gramme de fer.

La variation d'énergie libre ($\Delta F = \Delta F_1 - \Delta F_2$) est liée à la différence des potentiels E'_0 et $E'_{0.4}$: $\Delta F = \Delta F_1 - \Delta F_2 = \gamma (E'_0 - E'_{0.4})$. On obtient à 30°C en présence de guanidine 0,9 molaire

$$\text{à pH } 6,0 : \Delta F \approx 970 \text{ cal/mol.}$$

$$6,5 : \Delta F \approx 970 \text{ cal/mol.}$$

$$7,0 : \Delta F \approx 760 \text{ cal/mol.}$$

$$7,5 : \Delta F \approx 280 \text{ cal/mol.}$$

* Colson-Guastalla [6] a montré que la variation du taux d'urée produisait des modifications réversibles du potentiel.

Variation de $(E'_0 - E'_{0.9})$ avec la température.

Puisque $E'_0 - E'_{0.9} = \frac{\Delta F}{T}$, il est possible d'atteindre la variation de la différence d'énergie libre avec la température ($\delta \Delta F / \delta T$) en mesurant la variation avec la température de la f.e.m. $(E'_0 - E'_{0.9})$ d'une pile constituée par deux récipients, l'un contenant la méthémoglobine demi-réduite, l'autre la même en présence de guanidine.

On entreprend simultanément deux titrages d'oxydoréduction en partant de méthémoglobine tamponnée à un pH voisin de 6,8. Les deux solutions sont tamponnées au même pH et sont à la même température (30°C); elles n'accusent par conséquent aucune différence entre elles. Lorsque l'on arrive au point de demi-réduction (facilement repérable par référence à la valeur préalablement établie pour ce pH), on injecte dans un des récipients une quantité calculée d'une solution de chlorhydrate de guanidine préalablement amenée au même potentiel, de façon que la concentration finale en guanidine soit 0,9 molaire. On attend la stabilisation du potentiel du mélange. La stabilisation acquise, on lit directement la différence de potentiel entre l'électrode plongeant dans le mélange protéine-guanidine et celle enregistrant le potentiel sans guanidine; on mesure ainsi directement la f.e.m. de la pile décrite ci-dessus, soit $\Delta E = E'_0 - E'_{0.9}$. On refroidit rapidement le bain en remplaçant l'eau à 30°C par de l'eau à 10°C et l'on maintient la température à cette valeur. Après la mise en équilibre de la température, on lit de nouveau la f.e.m. de la pile. Cette opération est suivie d'un retour de la température du bain à 30°C; on peut ainsi vérifier si le potentiel de chaque électrode par rapport à l'électrode à calomel

(maintenue toujours à 30°C) revient à sa valeur initiale. Il en est ainsi à 1 à 3 mV près lorsque le pH est voisin de 6,8. Il nous a été possible, avec des mélanges tamponnés à pH 6,8 environ, de procéder, après ce retour, à l'achèvement du titrage, ce qui rend possible la correction de l'erreur due à un mauvais repérage du potentiel de demi-réduction. Notons que cette erreur est très réduite si les valeurs du potentiel mesuré pour les deux solutions avant de procéder à l'injection de guanidine sont très proches, condition que l'on a soigneusement observée.

Les expériences décrites ci-dessus sur l'effet d'une variation de la température ($\delta T = \pm 20^\circ\text{C}$, entre 30° et 10°C) sur ΔE montrent que cet effet est nul ou si petit qu'il est compris dans les marges d'erreur. Ceci implique que la différence des variations d'entropie ΔS ($= \Delta S_1 - \Delta S_2$) est nulle. Ce résultat ne nous permet pas de conclure s'il y a une variation d'entropie liée à l'action de la guanidine sur l'hémoglobine et la méthémoglobine séparément; mais on en peut conclure que si l'effet entropique existe, il est comparable pour les deux cas, de sorte que la différence des variations est nulle.

Au contraire, comme on a pu le voir dans la première partie, la variation de potentiel apportée par l'urée est modifiée par la température; cette modification correspond à une différence de 16 cal/degré/mole sur les variations d'entropie liées à l'action de l'urée sur l'hémoglobine et la méthémoglobine respectivement.

* * *

B. Analyse de l'action de la guanidine.

L'analyse de l'action primaire de la guanidine impose un examen de l'action de ce corps, 1) sur la liaison hémine-globine, 2) sur le groupe prosthétique, et 3) sur la partie globine.

L'action du chlorhydrate de guanidine sur les liaisons hémine-globine doit se confondre avec l'effet d'une augmentation de force ionique du milieu. Le chlorhydrate de guanidine est un électrolyte fort. L'ion guanidium existe comme tel jusqu'à un pH très élevé (pK_{ab} pour guanidium = 13,65). Dans la région de pH qui nous intéresse (comprise entre 5,8 et 7,5), la modification de force ionique du milieu est donc égale à celle que produit le chlorure de sodium 0,9 molaire. Cette augmentation provoque sans doute un affaiblissement des liaisons ferrihémine-globine et ferrohémine-globine (les liaisons sont électrostatiques). Mais son effet global sur le potentiel ne peut être sensible. Les expériences montrent que le potentiel d'oxydoréduction du système hémoglobine-méthémoglobine n'accuse pas de variation sensible en présence de chlorure de sodium molaire.

Un effet complexant spécifique est à considérer. Certaines données spectrales laissent prévoir un tel effet; nous nous proposons d'examiner ces données ainsi que les éléments magnétochimiques permettant d'en préciser le caractère.

1. Action de l'ammoniaque et de la guanidine sur le spectre d'absorption de la méthémoglobine basique.

Il est connu [37] que le spectre de la méthémoglobine basique est modifié en présence d'ammoniaque. L'action de cette dernière consiste à supprimer la bande d'absorption à 578 mμ, et à déplacer le minimum de 510 mμ à 500 mμ (figure 19). A pH 6,6 où la totalité de la méthémoglobine se trouve sous forme acide, et l'ammonium sous forme NH_4^+ , il n'y a pas de modification spectrale.

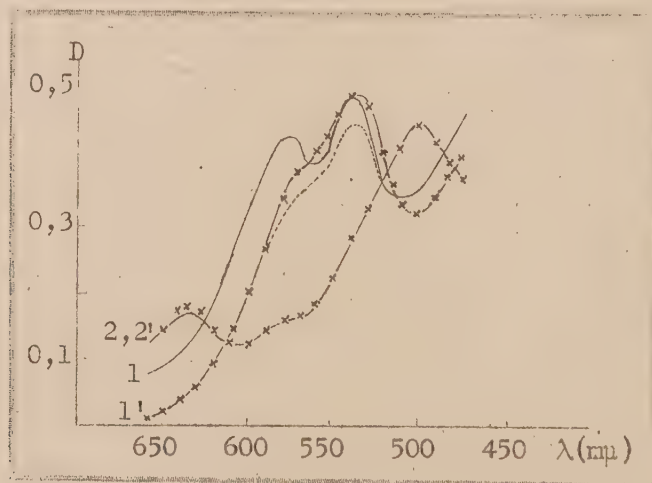


Figure 19. Effet de l'ammoniaque et de la guanidine sur le spectre d'absorption de la méthémoglobine acide et basique.

Les deux courbes (1,2) en trait plein correspondent à la méthémoglobine seule en tampon borate et phosphate, pH 10,2 et 6,6 respectivement 1', 2' (x) : en présence de chlorure d'ammonium (0,9 M).

La courbe en trait pointillé correspond à la méthémoglobine à pH 9,8 après évolution pendant 20 minutes en présence de guanidine. Méthémoglobine $5 \cdot 10^{-5}$ M. Densité optique sur 1 cm.

Ces faits sont à rapprocher des données magnétochimiques antérieures de Coryell et Stitt [13] qui les ont conduits à formuler l'hypothèse de

la formation d'un complexe covalent entre la méthémoglobine basique et l'ammoniaque. On constate l'absence de toute action de l'ammoniaque dans ce sens sur l'hémoglobine.

Ces auteurs préconisent une réaction d'équilibre décrite par l'équation $M Hb OH + NH_3 \rightleftharpoons M Hb OH.NH_3$ dont ils déterminent la constante d'équilibre ($K_{\text{association}} = 1,03$). La valeur de la susceptibilité magnétique du complexe prévoit des liaisons essentiellement covalentes. L'hypothèse d'une réaction compétitive du type $M Hb OH + NH_3 \rightleftharpoons M Hb.NH_3 + OH$ est écartée, du fait que le titrage de la méthémoglobine basique (MHbOH) par l'ammoniaque ne lâche pas d'ion hydroxyle dans le milieu. Afin de surmonter des difficultés d'ordre structural ces auteurs ont recours à l'hypothèse de l'heptacoordination du fer, la septième position de coordination étant prise par le groupe NH_3 .

Nous avons remarqué un effet analogue de la guanidine sur le spectre de la méthémoglobine basique. Cet effet consiste également à supprimer la bande d'absorption à 578 mμ; mais contrairement à l'action de l'ammoniaque, la disparition de cette bande s'effectue suivant une vitesse mesurable. On peut suivre la cinétique de cette réaction en se plaçant dans des conditions convenables; elle est d'ordre 1. Le fait important est que le spectre d'absorption du produit à la fin de cette évolution est sensiblement analogue à celui que l'on obtient par action de l'ammoniaque sur la méthémoglobine basique.

Ces faits impliquent une certaine analogie entre l'action de l'ammoniaque et celle de la guanidine. Si la guanidine peut se complexer d'une façon analogue avec la méthémoglobine et non pas avec l'hémoglobine

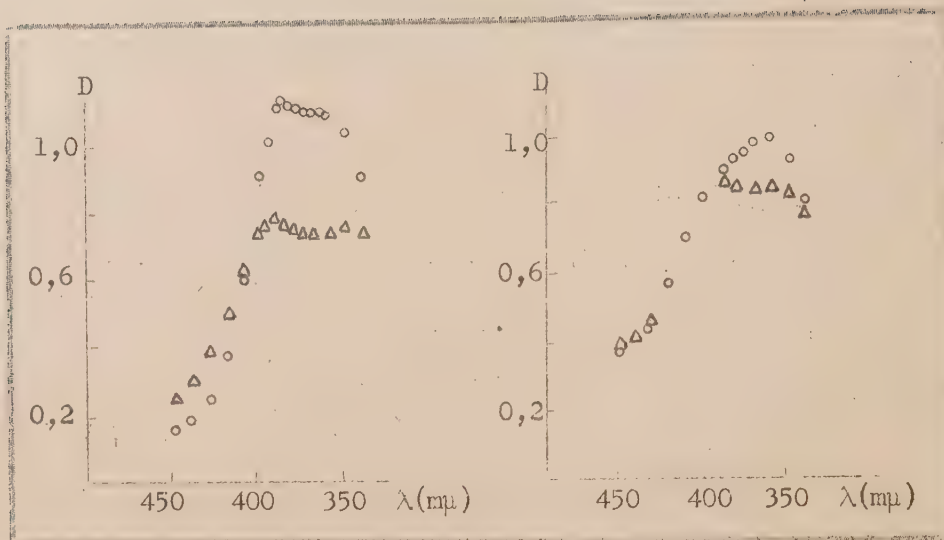


Figure 20.

Effet de la guanidine sur le spectre d'absorption d'hémine acide et basique, dans la région de la bande de Soret.

Hémine 10^{-4} M; densité optique 2 mm.

A gauche: hémine basique, tampon borate pH 9,5.

- hémine en tampon
- △ hémine en tampon + chlorhydrate de guanidine (0,5 M).

A droite: hémine acide, tampon phosphate pH 6,5.

- hémine en tampon
- △ hémine en tampon + chlorhydrate de guanidine (0,5 M).

(parallèlement à l'ammoniaque), on pourrait concevoir de ce fait un abaissement du potentiel d'oxydoréduction du système hémoglobine-méthémoglobine. On peut se demander si l'action primaire de la guanidine, d'où résulte l'abaissement du potentiel de demi-réduction de la méthémoglobine, peut s'identifier à quelque action complexante de ce corps. Pour élucider ce problème, il s'est agi dans notre esprit de chercher 1) si la guanidine se complexe avec l'hémine, 2) si la guanidine se complexe avec la méthémoglobine basique et acide, et 3) si le fait de cette complexion (au cas où il y en a) pourrait expliquer l'action primaire de la guanidine sur le potentiel.

Nous avons essayé d'apporter, d'abord par mesures spectrales, puis par mesure de susceptibilité magnétique, les éléments relatifs à la réaction entre la guanidine d'une part et l'hémine et la méthémoglobine de l'autre. La figure 20 montre le spectre d'absorption de l'hémine acide et basique dans la région de la bande de Soret, en tampon seul et en présence de la guanidine (0,5 M). L'ensemble des résultats montre que le spectre de l'hémine est effectivement modifié en présence de guanidine. Ceci est valable aussi bien à pH 6,5 où l'hémine et la guanidine se trouvent toutes deux dans leurs formes respectives d'acide conjuguées, qu'à pH 9,5 où l'hémine basique rencontre la guanidine forme acide.

2. Action de la guanidine sur la susceptibilité magnétique de la méthémoglobine (basique et acide).

a) Mesure des susceptibilités magnétiques.

Pour mesurer la susceptibilité magnétique on s'est servi d'un appareil

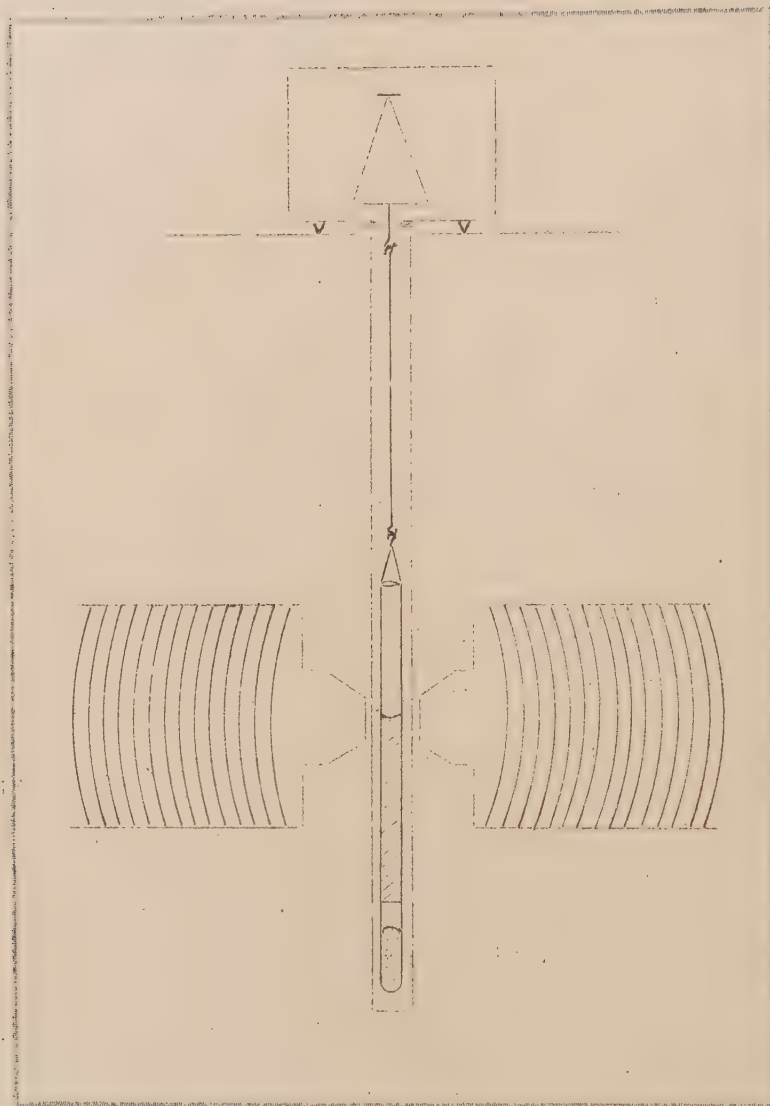


Figure 21.

Schéma de l'installation destinée à la mesure
de la susceptibilité magnétique d'une solution.

analogue à celui mis au point par Pascal. Les éléments principaux en sont un électro-aimant et une balance de précision monoplateau; la précision de cette dernière est de cinq centièmes de milligrammes.

La balance dans sa cage est placée sur une table. Des trous pratiqués dans le plancher de la balance et dans la table laissent passer le fil de suspension du tube de mesure. Les tubes utilisés sont en verre Pyrex; ils ont 6 ou 11 millimètres de diamètre intérieur et 22 centimètres de longueur. On les suspend à l'aide de crochets. Les tubes sont lestés par une certaine quantité de mercure contenue dans un compartiment isolé à la partie inférieure, ce qui permet une meilleure stabilité du tube lorsqu'il est suspendu. L'ensemble du tube et du fil de suspension est entouré d'un long cylindre de verre qui sert à mettre l'appareillage à l'abri des courants d'air. Avant chaque mesure on s'assure, au moyen d'un cathétomètre, que la surface de séparation liquide-air est toujours sur l'axe des pièces polaires, en une position telle que le champ soit maximum et présente un gradient nul.

Les pièces polaires sont montées sur un électro-aimant classique à enroulement de cuivre refroidi par l'eau. Les pièces étant taillées en acier de faible hystérésis, la valeur du champ magnétique à chaque instant peut être repérée par l'intensité du courant magnétisant.

b) Matériel.

Hémine en solution, 50 mg/cm³, en solution de soude 0,2 M.

Ammoniaque 7,0 molaire.

Chlorhydrate de guanidine 7,0 molaire.

Méthémoglobine 16 millimolaire (en atome de fer), préparée à partir de l'oxyhémoglobine de cheval par auto-oxydation à pH 4,9, suivant le procédé de Coryell et Stitt, ramenée à pH 7,5 ou 10,0 par addition, avec agitation efficace, de soude molaire.

c) Pratique d'une mesure.

On emplit le tube de mesure avec l'échantillon jusqu'au niveau d'un trait marqué sur la paroi (environ 10 cm du fond). Lorsque le tube est suspendu, on le pèse en absence de courant magnétisant. On reprend les pesées après avoir créé le champ, pour diverses valeurs du courant magnétisant que l'on ajuste à l'aide d'un rhéostat. Dans notre cas, nous avons utilisé des champs correspondant à 5, 6, 7, 8, 9 et 9,8 ampères. On porte la variation de poids (Δp) qui en résulte en fonction du courant. On opère de même pour le solvant pur (figure 22). La différence des valeurs des Δp ($\Delta p_{\text{solution}} - \Delta p_{\text{solvant}}$) pour un champ donné représente l'action du gradient du champ sur le corps en solution.

La connaissance de la concentration de la solution permet, par comparaison avec un corps de référence de susceptibilité connue, de calculer la susceptibilité molaire du soluté. Pour isoler la contribution paramagnétique de la susceptibilité, il serait nécessaire de travailler à plusieurs températures.

Une variation de la température dans un domaine suffisamment étendu aurait été peu pratique sur nos échantillons (solutions concentrées de méthémoglobine et d'hémine); nous nous sommes donc bornés à des mesures à une température unique (20°C); les résultats correspondent ainsi à la susceptibilité paramagnétique "apparente" à cette température.



Figure 22. Variation du poids du tube de mesure en fonction du courant magnétisant.

En ordonnées: Δp en milligrammes. En abscisses: courant en ampères.

- Tube de mesure rempli par le solvant.
- ▲ Tube de mesure rempli par la solution.

Solution: hémine 50 mg/cm³, en solution dans la soude 0,2 M.

Solvant: soude 0,2 M.

d) Résultats.

Nous nous sommes contentés dans ce travail de suivre le sens et le degré de la variation de la susceptibilité paramagnétique apparente de la méthémoglobine et de l'hémine que provoque la présence de concentrations croissantes de guanidine. On opère en titrant une solution d'hémine ou de méthémoglobine par la guanidine; on mesure à chaque étape la susceptibilité

apparente du mélange. Les mélanges de méthémoglobine et de guanidine tendent rapidement à devenir inhomogènes (par suite de l'action dénaturante de la guanidine) quand la concentration de cette dernière augmente ($>0,5M$). Les mesures magnétiques dans cette région de concentration sont donc faites rapidement après mélange. On atteint chaque concentration de guanidine par une expérience indépendante, en se servant des solutions pures de méthémoglobine (16 mM) et de guanidine (7 M). On déduit le diamagnétisme du réactif (chlorhydrate de guanidine, ammoniacque, etc.) pour chaque titre à partir des valeurs déterminées expérimentalement. On corrige également l'effet de dilution afin d'exprimer ($\Delta p_{\text{solution}} - \Delta p_{\text{solvant}}$) relatifs à une concentration molaire d'hémine ou d'hémoprotéine. Les figures 23 et 24 montrent le résultat de ces expériences; le paramagnétisme apparent des mélanges (après corrections appropriées) à chaque étape du titrage y est exprimé en pourcentage, celui des solutions pures d'hémine et de méthémoglobine étant pris égal à cent *. La marge d'erreur globale

* Nous avons profité de l'appareillage pour étudier l'influence d'une forte concentration d'urée et de pilocarpinate sur la susceptibilité paramagnétique de l'hémine. Le paramagnétisme apparent de l'hémine (par atome-gramme de fer) reste inchangé en présence d'urée (urée 3,6 molaire en présence d'hémine 49 millimolaire). Ce fait montre que le complexe hémine-urée est électrovalent.

La susceptibilité apparente d'un mélange d'hémine et de pilocarpinate (53 millimolaire contre molaire) accuse une légère augmentation (20 % par rapport à celle de l'hémine). Ce résultat, rapproché de ceux de Pauling et Coryell [30] légitime notre discussion dans la première partie de cette étude où d'autres résultats nous ont amené à considérer la liaison ferri-hémine-base comme électrovalente.

L'augmentation de susceptibilité peut être expliquée par le fait que souvent, en solution alcaline, la susceptibilité de l'hémine mesurée expérimentalement se trouve légèrement au-dessous de sa valeur réelle, ceci étant dû, entre autres causes, au phénomène d'agrégation. On atteint la valeur réelle de la susceptibilité en mettant du sucrose en solution, ce que nous n'avons pas fait.

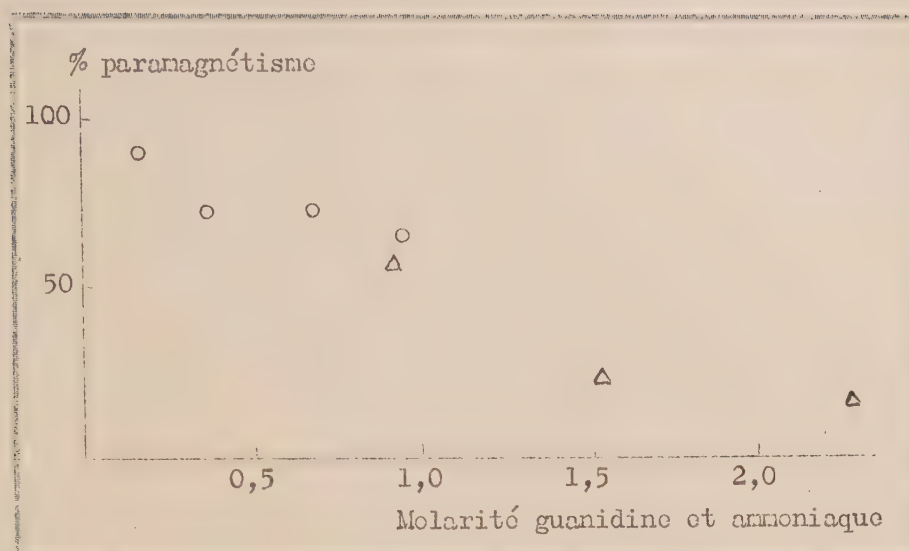


Figure 23. Modification du paramagnétisme apparent de l'hémine par l'ammoniacque et la guanidine.

Hémine: 50 mg/cm³ en solution dans la soude 0,2 M.

En ordonnées: pourcentage paramagnétisme restant.

En abscisses: molarité d'ammoniacque et de guanidine.

○ Ammoniacque

△ Guanidine

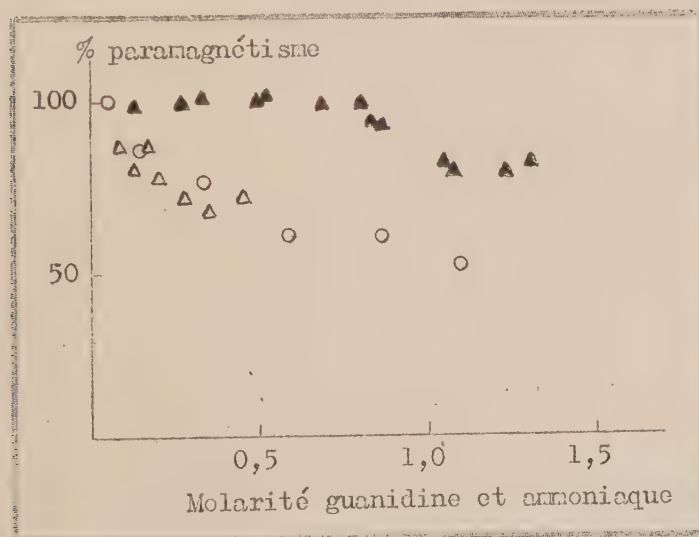


Figure 24. Modification du paramagnétisme apparent de la méthémoglobine basique et acide en présence de guanidine et d'ammoniacque.

En ordonnées: pourcentage paramagnétisme restant.

En abscisses: molarité d'ammoniacque et de guanidine.

- Méthémoglobine basique (pH 10,0) + NH₃
- △ Méthémoglobine basique (pH 10,0) + guanidine
- ▲ Méthémoglobine acide (pH 7,5) + guanidine.

est inférieure à 8 pour cent.

On voit d'après ces résultats que:

- 1) Le paramagnétisme apparent de l'hémine diminue en présence de guanidine en solution alcaline; d'où l'on conclut à la formation d'un complexe covalent hémine-guanidine en solution alcaline. Un tel titrage étant peu pratique en milieu neutre tamponné (il y a précipitation), on ignore s'il y a une conjugaison de même caractère entre les formes acides conjuguées de l'hémine et de la guanidine.
- 2) Le paramagnétisme apparent de l'hémine diminue en présence d'ammoniaque, en solution alcaline, ce qui indique la formation d'un complexe covalent.
- 3) Le paramagnétisme apparent de la méthémoglobine basique (pH 10) diminue en présence de guanidine. On retrouve également le résultat de Coryell et Stitt pour la méthémoglobine basique en présence d'ammoniaque.
- 4) Un mélange de méthémoglobine acide (pH 7,5) et de guanidine conserve le paramagnétisme apparent initial (par atome de fer) de l'hémoprotéine jusqu'à une concentration importante de guanidine. A concentration élevée de cette dernière ($\sim 1,0$ M), les résultats montrent un abaissement de susceptibilité paramagnétique apparent ; la précision des mesures dans cette zone est incertaine puisque le mélange tend à devenir inhomogène par suite de l'action dénaturante de la guanidine. On relève nettement l'absence de toute action de la guanidine sur le paramagnétisme apparent de la méthémoglobine acide jusqu'à une concentration de 0,8 M en guanidine.

3. Conclusion.

D'après ces résultats il nous semble qu'il y a lieu de considérer deux aspects, indépendants ou non, de l'action globale de la guanidine sur la méthémoglobine. L'un comprend l'action dénaturante qui progresse plus ou moins vite selon les conditions de pH, concentration, etc.; l'autre consiste en la formation d'un complexe avec le groupe prosthétique. Entre pH 9 et pH 10, la guanidine apporte à la fois à la méthémoglobine un abaissement de la susceptibilité paramagnétique et une modification spectrale; l'un et l'autre effets sont comparables à ceux que produit l'ammoniaque. On peut donc penser à la formation d'un complexe covalent de la méthémoglobine basique et de la guanidine. La modification apportée par la guanidine au spectre de la méthémoglobine basique (disparition de la bande à 578 mμ) est une réaction à vitesse définie; la modification analogue que produit l'ammoniaque est instantanée. En supposant que la modification spectrale de part et d'autre est la conséquence de la conjugaison de l'ammoniaque et de la guanidine avec le fer, il semble que l'ammoniaque est favorisée par l'accès immédiat au voisinage de l'atome de fer, tandis que la guanidine ne l'est pas. Un empêchement d'ordre stérique peut être envisagé. Notons au passage que la triméthylamine n'entraîne pas de modification du spectre de la méthémoglobine dans les conditions où agit l'ammoniaque. Ceci est à rapprocher des résultats de St. George et Pauling [33]: alors que la nature et les dimensions des isocyanures n'ont aucune influence sur leurs affinités vis-à-vis de l'hémine libre, elles ont un effet notable sur leurs affinités vis-à-vis de l'hémoglobine; ainsi l'isocyanure de butyle tertiaire a pour l'hémo-

globine une affinité 200 fois moins grande que l'isocyanure d'éthyle.

L'accès des molécules de guanidine à proximité de l'atome de fer serait-il commandé par le dérangement d'un groupe quelconque dans le voisinage? Si c'est le cas, la cinétique de la modification spectrale en présence de la guanidine représenterait la cinétique de l'action de cette dernière sur le groupe gênant.

On peut se demander si le processus de complexion et le processus de dénaturation ne seraient pas liés dans ces conditions expérimentales (solution alcaline).

A un pH plus acide (7,5), on n'observe aucune variation de la susceptibilité paramagnétique en présence de guanidine et l'on ne peut conclure à la possibilité d'une complexion.

En aucun cas on n'a observé de modification spectrale immédiate, ce qui exclut l'éventualité d'une complexion immédiate de la guanidine. Or, dans les conditions d'étude de l'effet de la guanidine sur le potentiel (pH compris entre 5,8 et 7,5), l'abaissement observé est antérieur à toute transformation spectrale. Cet effet immédiat ne peut donc être attribué à une éventuelle complexion qui ne pourrait se manifester que plus tard.

Notons que l'ammoniaque, à pH 10, abaisse le potentiel de demi-réduction de la méthémoglobine de 30 mV environ, sans doute par suite de l'action complexante préférentielle pour la forme oxydée. L'ion NH_4^+ (pH < 8,4), faute de pouvoir complexant, n'en est pas capable.

C. Résumé, deuxième partie.

1. Le chlorhydrate de guanidine (0,9 M) agit sur le système hémoglobine-méthémoglobine de cheval de façon à abaisser le potentiel d'oxydoréduction de 45 à 15 mV selon le pH. L'ionisation de la méthémoglobine à pK 6,5 disparaît.

2. L'action de la guanidine est immédiate et se produit, comme celle de l'urée, en dehors de toute transformation dénaturante proprement dite. Mais la modification du potentiel apportée par la guanidine est insensible à une variation de température. Ce fait, et la disparition d'une ionisation de la méthémoglobine en présence de guanidine, semblent montrer que l'action immédiate de la guanidine est d'un caractère différent de l'action immédiate de l'urée sur les hémoprotéines.

3. L'affaiblissement des liaisons hème-globine par suite de l'augmentation de force ionique du milieu ne peut expliquer l'action immédiate de la guanidine sur le potentiel d'oxydoréduction.

4. Les modifications du spectre d'absorption et de la susceptibilité paramagnétique de la méthémoglobine basique en présence de guanidine sont analogues à celles que l'on observe en présence d'ammoniaque et laissent prévoir la formation d'un complexe covalent.

La susceptibilité paramagnétique de la méthémoglobine acide n'est pas modifiée en présence de guanidine et l'on ne peut conclure à la possibilité d'une complexion.

En aucun cas on n'observe de modification spectrale immédiate à

laquelle pourrait être liée une complexion. Le caractère immédiat de l'effet de la guanidine sur le potentiel d'oxydoréduction du système hémoglobine-méthémoglobine exclut donc d'expliquer par une complexion avec la guanidine la variation de potentiel observée.

*

*

*

CONCLUSIONS

On a tenté dans cette étude de localiser l'action primaire de l'urée et de la guanidine sur les molécules d'hémoglobine et de méthémoglobine, actions manifestées par l'abaissement immédiat du potentiel du système oxydoréducteur hémoglobine-méthémoglobine.

Diverses hypothèses sont à écarter. Bien que l'urée et la guanidine puissent se complexer à l'hémine, groupe prosthétique, cette propriété ne peut expliquer l'abaissement du potentiel, ni par l'urée ni par la guanidine. L'affinité de l'hémine pour l'urée est petite; on ne conçoit pas de déplacement sensible de l'équilibre hémine-globine par la présence simultanée d'urée même à concentration relativement élevée.

Dans le cas de la guanidine, on a certes pu mettre en évidence un effet complexant en solution basique; mais l'effet sur le potentiel est immédiat et précède toute transformation spectrale qui aurait pu résulter d'une éventuelle complexion.

On ne peut se tenir non plus à l'hypothèse d'un affaiblissement des liaisons hémine-globine par l'augmentation de la constante diélectrique qu'apporte la présence d'urée. L'étude des complexes hémine-bases azotées a montré que l'effet de l'urée sur le potentiel de ces systèmes s'expliquait par l'augmentation de la constante diélectrique du milieu par l'urée. La modification du potentiel dans un système contenant ces complexes est

liée à la modification de leurs constantes de dissociation. L'augmentation de la constante diélectrique agit sur la dissociation du complexe ferrihémine-base, mais n'agit pas sur celle du complexe ferrohémine-base; on sait que la liaison ferrihémine-base est électrovalente, tandis que celle de ferrohémine-base est covalente. Or, dans le cas des liaisons hémine-globine, les formes réduite et oxydée sont électrovalentes, comme le montrent les mesures magnétochimiques. L'effet global, en admettant qu'il ne soit pas nul, ne peut être sensible. Une forte concentration saline (ClNa 1,0 M) qui entraîne sans doute un affaiblissement de ces liaisons, a un effet négligeable sur le potentiel. Ces raisons mêmes font écarter l'hypothèse d'un effet d'accroissement de la force ionique dans le cas du chlorhydrate de guanidine.

Il y a donc des raisons de croire que l'action de l'urée et de la guanidine se situe sur la partie globine de la molécule. L'action de l'urée n'est pourtant pas analogue à celle de la guanidine. En présence d'urée le potentiel d'oxydoréduction est abaissé, en conservant toutefois la loi de variation du potentiel en fonction du pH. Une ionisation de la méthémoglobine native (pK 6,5) qui provoque la cassure dans la courbe du potentiel en fonction du pH est toujours active en présence d'urée 4 M. Par contre, en présence de guanidine (0,9 M) cette ionisation disparaît.

Certaines données thermodynamiques soulignent cette différence. La modification du potentiel d'oxydoréduction par l'urée varie de façon sensible avec la température: on peut donc dire que l'action de l'urée sur l'hémoglobine et la méthémoglobine respectivement correspond à des variations d'entropie différentes ($\Delta S = 16$ unités). Par contre, dans le cas

de l'action de la guanidine, cette différence est nulle.

Ces considérations laissent entendre que l'action de divers agents dénaturants cependant apparentés peut provoquer dans la molécule de la même protéine des transformations primaires de caractères différents. Ces différences font penser à la multiplicité des premières voies conduisant aux modifications profondes de dénaturation.

* *

*

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Barron, E.S.G., J.Biol.Chem., 1937, 121, 285.
- 2 Clark, W.M., The Determination of Hydrogen Ions. Baltimore, 1928.
- 3 Clark, W.M., Perkins, M.E., J.Biol.Chem., 1940, 135, 643.
- 4 Clark, W.M., Taylor, J.F.; Davies, T.H., Vestling, C.S., J.Biol.Chem., 1940, 135, 543.
- 5 Cohn, E.J., Green, A.A., Blanchard, M.H., J.Am.Chem.Soc., 1937, 59, 509.
- 6 Colson-Guastalla, H., Thèse, Paris 1956.
- 7 Conant, J.B., Harvey Lectures, 1932-33, 28, 159.
- 8 Conant, J.B., Allos, G.A.; Tongberg, C.O., J.Biol.Chem., 1928, 79, 89.
- 9 Conant, J.B., Fieser, L.F., J.Biol.Chem., 1925, 62, 595.
- 10 Conant, J.B., Pappenheimer, A.M., J.Biol.Chem., 1932, 98, 57.
- 11 Corwin, A.H., Erdman, J.G., J.Am.Chem.Soc., 1946, 68, 2473.
- 12 Coryell, C.D., J.Phys.Chem., 1939, 43, 841.
- 13 Coryell, C.D., Stitt, F., J.Am.Chem.Soc., 1940, 62, 2942.
- 14 Coryell, C.D., Stitt, F., Pauling, L., J.Am.Chem.Soc., 1937, 59, 633.
- 15 Cowgill, R.W., Clark, W.M., J.Biol.Chem., 1952, 198, 33.
- 16 Davies, T.H., J.Biol.Chem., 1940, 135, 597.
- 17 Drabkin, D.L., Austin, J.H., J.Biol.Chem., 1935, 112, 89.
- 18 Dunning, W.J., Shutt, W.J., Trans.Faraday Soc., 1938, 34, 479.
- 19 Fischer, H., Organic Synthesis, 1941, 21.
- 20 Fischer, H., Orth, H., Die Chemie des Pyrrols, Pyrrolfarbstoffe, II. Erste Hälfte, Akadem.Verlagsgesellschaft, Leipzig 1937. Consultés dans [27].

- 21 German, B., Wyman, J., J.Biol.Chem., 1937, 117, 533.
- 22 Gralen, N., Biochem.J., 1939, 33, 1907.
- 23 Hastings, A.B., van Slyke, D.D., Neill, J.M., Heidelberger, M., Harrington, C.R., J.Biol.Chem., 1924, 60, 89.
- 24 Henderson, L.J., J.Biol.Chem., 1920, 41, 401.
- 25 Kalmus, E., Z.Physiol.Chem., 1910, 70, 217.
- 26 Kennedy, R.P., J.Biol.Chem., 1927, 74, 385.
- 27 Lemberg, R., Legge, J.W., Hematin Compounds and Bile Pigments. Interscience, New York 1949.
- 28 Michaelis, L., Hill, E.S., Schubert, M.P., Biochem.Z., 1932, 255, 66.
- 29 Pauling, L., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1935, 21, 186.
- 30 Pauling, L., Coryell, C.D., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1936, 22, 159.
- 31 Pauling, L., Coryell, C.D., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 1936, 22, 210.
- 32 Shack, J., Clark, W.M., J.Biol.Chem., 1947, 171, 143.
- 33 St.George, R.C.C., Pauling, L., Science, 1951, 114, 629.
- 34 Taylor, J.F., J.Biol.Chem., 1942, 144, 7.
- 35 Taylor, J.F., Hastings, A.B., J.Biol.Chem., 1939, 131, 649.
- 36 Taylor, J.F., Morgan, V.E., J.Biol.Chem., 1942, 144, 15.
- 37 Theorell, H., Ehrenberg, A., Acta Chem.Scand., 1951, 5, 823.
- 38 Wyman, J., J.Biol.Chem., 1939, 127, 1.
- 39 Wyman, J., J.Biol.Chem., 1939, 127, 581.
- 40 Wyman, J., Adv.Protein Chemistry, 1948, 4, 407.
- 41 Zeynek, R., Z.Physiol.Chem., 1910, 70, 224.

*

*

*

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

QUELQUES PROPRIÉTÉS DES PROTÉINES ÉTALÉES OU ADSORBÉES AUX SURFACES LIBRES LIQUIDES

Vu et approuvé :
Paris, le 22 Mai 1959

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
J. PERES

Vu
et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean SARRAILH

